

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie animale

FACULTE DES SCIENCES

Professeur H. HUGGEL

Professeur G. de HALLER

LE POTENTIEL DE MEMBRANE ET LES MOUVEMENTS
CILIAIRES CHEZ STYLONYCHIA MYTILUS
ET LEURS MODIFICATIONS EN FONCTION
DE LA COMPOSITION IONIQUE DU MILIEU

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de
docteur ès sciences biologiques

par

Jacques Etienne de PEYER

de

Versoix (Genève)

Thèse N° 1617

GENEVE

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0037

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie animale

FACULTE DES SCIENCES

Professeur H. HUGGEL

Professeur G. de HALLER

LE POTENTIEL DE MEMBRANE ET LES MOUVEMENTS
CILIAIRES CHEZ STYLONYCHIA MYTILUS
ET LEURS MODIFICATIONS EN FONCTION
DE LA COMPOSITION IONIQUE DU MILIEU

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de
docteur ès sciences biologiques

par

Jacques Etienne de PEYER

de

Versoix (Genève)

Thèse N° 1617

GENEVE

1973



La faculté des sciences, sur le préavis du professeur H. Huggel, directeur de thèse, du professeur de Haller et du professeur assistant J.J. Dreifuss, du département de physiologie de la Faculté de Médecine, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 17 mai 1973

Le doyen:
Jean MULLER

Thèse N° 1617



Je tiens à exprimer au professeur Hansjorg Huggel ma reconnaissance pour avoir accepté de diriger cette thèse et m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également au professeur Gérard de Haller qui a été l'initiateur de cette recherche, et dont l'appui constant m'a été d'un grand secours.

Je remercie aussi le docteur docent Stanislaw Dryl de Varsovie qui m'a invité en Pologne et m'a ainsi permis de profiter de sa grande expérience des problèmes de physiologie des protozoaires.

Je voudrais enfin exprimer ma gratitude au docteur Jean-Jacques Dreifuss dont les conseils m'ont été très précieux et qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire parti du jury.

Table de matière

	Page
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : Phénomène de Gibbs-Donnan	
Matériel et méthodes	6
Resultats	8
DEUXIEME PARTIE : Investigations électro-physiologiques	
Méthodes	21
Potentiel de membrane	24
Effet de la variation du rapport des concentrations Potassium-Calcium	31
Quelques autres facteurs ioniques affectants la durée, l'intensité ou la forme de la réponse	39
DISCUSSION	52
BIBLIOGRAPHIE	64

INTRODUCTION

Un comportement quel qu'il soit implique un mécanisme de coordination très complexe.

L'analyse d'un tel mécanisme est délicat, particulièrement dans le cas des métazoaires, par le grand nombre de cellules qui sont concernées. Une approche plus simple du problème devrait pouvoir être réalisée par l'étude des mécanismes de comportement des organismes unicellulaires.

C'est pourquoi au cours des quinze dernières années les protozoaires, et particulièrement les ciliés, sont devenus un modèle classique d'étude des phénomènes de la matière vivante tant au niveau cellulaire qu'au niveau subcellulaire.

Si les observations faites au niveau du microscope électronique ont permis d'accroître considérablement nos connaissances sur la structure des cils, il n'en reste pas moins que les explications du processus du mouvement ciliaire restent très hypothétiques que ce soit au niveau physiologique, biochimique ou histo-chimique.

La modification la plus remarquable et la plus étudiée associée à l'excitation cellulaire est l'inversion des cils caractérisée par l'inversion de la direction de la nage ou du sens des mouvements ciliaires, chez les petits organismes.

En effet, les protozoaires sont capables de répondre à une grande variété de stimuli, aussi bien physiques que chimiques, par une modification de la direction ou du type de nage. On sait depuis de nombreuses années

que ces réponses motrices ne sont pas uniformes, mais peuvent varier selon le type et l'intensité des stimuli.

La première description d'un tel phénomène nous est donnée par Jennings en 1897, chez Paramecium. Il a caractérisé ce qu'il appelait "avoiding reaction" en réponse à un changement local des conditions du milieu comme étant le résultat d'un renversement soudain de la nage suivi d'une rotation de la partie antérieure et enfin d'un retour au mouvement initial dans une direction nouvelle.

Si l'on considère le problème sous son aspect théorique on est nécessairement amené à faire intervenir des mécanismes chimiques et ioniques.

En 1923, Merton travaillant sur Stentor, puis en 1926 Mast et Nadler sur Paramecium, ont montré que seul les cations monovalents sont à même de provoquer une inversion ciliaire, alors que les cations bivalents ne provoquent pas cet effet. Ils en conclurent que le déséquilibre ionique produit une rupture de l'équilibre électrique au niveau de la membrane et que cette rupture est responsable de l'induction de l'inversion ciliaire.

Cette hypothèse selon laquelle les différents agents chimiques étudiés créeraient l'inversion ciliaire directement par leur action spécifique, devait être abandonnée après les expériences réalisées dans ce domaine par Kamada (1940) sur Paramecium. Celui-ci devait montrer au moyen d'injection intracellulaire, que l'augmentation du KCl intracellulaire ne provoque pas d'inversion, contrairement à l'injection d'un agent précipitant le Ca^{++} libre.

La même année, en collaboration avec Kinosita, il effectua une série d'expériences à la suite desquels il conclut à un antagonisme calcium - potassium. Ces résultats le conduisirent à imaginer un système comprenant un anion X cytoplasmique, capable de former avec le calcium un complexe $\text{Ca} - \text{X}$ stable, et dont la libération par suite d'une diminution du calcium libre intracellulaire est à l'origine du phénomène d'inversion de la nage.

Ce n'est que vingt ans plus tard que Jahn (1962), reprenant les résultats de Kamada et Kinosita, devait partiellement infirmer cette hypothèse. En effet, en appliquant le principe de Gibbs - Donnan à l'équilibre qui se crée entre la surface du cilié et la composition ionique du milieu externe, il devait démontrer que la durée de l'inversion reste constante lorsque la concentration de K^+ dans le milieu est proportionnelle à la racine carrée de la concentration de Ca^{++} , c'est à dire, lorsque l'on observe la relation $[\text{K}^+]/\sqrt{[\text{Ca}^{++}]} = \text{cte}$. Se basant sur la constance de cette relation, il suggéra que le potassium et le calcium sont tous deux liés à la membrane, le dernier l'étant par ses deux valences, et que ce n'est pas un anion cytoplasmique, mais la rupture de la liaison Ca-membrane selon un mécanisme identique à celui défini par Kamada, qui provoque l'inversion.

Cette conception n'est en fait pas tellement différente de celle de Kamada, si ce n'est en ce qui concerne la localisation du système échangeur de cations. Toutes deux font état du même fait important; le déplacement du calcium lié provoque une inversion ciliaire, quel que soit par la suite le sort des ions libérés.

En 1965 Grebecki confirmait l'importance de la relation de Gibbs-Donnan. Cependant par des expériences de décalcification basées essentiellement sur l'effet de chélateurs ou de précipitants du calcium, il tentait de démontrer que ce n'est pas simplement la diminution du calcium lié qui est responsable de l'inversion mais que ce comportement est en relation avec la quantité de calcium qui reste attachée aux sites d'adsorption et qui détermine l'état de la membrane cellulaire. Selon lui, il existerait une certaine gamme de valeurs de la concentration calcique à l'intérieur de laquelle il est possible d'obtenir une inversion, alors qu'en dessous comme en dessus de cette valeur, les mouvements restent normaux.

Naitoh (1968) a reproché à Grebecki de ne pas avoir tenu compte dans ses expériences de l'introduction d'ions monovalents dans la solution qui se produit nécessairement par l'adjonction du chélateur. Il proposa une nouvelle hypothèse selon laquelle le Ca^{++} libéré par un système échangeur d'ions cellulaire, en réponse à l'application externe d'autres cations, active un système contractile dont la source d'énergie est l'ATP, et dont la réponse a pour effet d'inverser la direction des mouvements ciliaires. Pour lui, la durée de l'inversion ne dépend donc pas de la quantité de Ca^{++} encore lié, mais de celle qui a été libérée des sites d'adsorption.

Quoi qu'il en soit, les expériences sur lesquelles ont été fondées ces hypothèses ont permis de mettre en évidence l'importance du calcium sur le comportement des ciliés.

Cependant, il n'existe pas d'études comparables concernant les Hypotriches. Or nous avons été amenés à nous intéresser à ceux-ci plus particulièrement à la suite des travaux effectués par Machemer (1965-1966-1969) qui a analysé les divers types de mouvements observés chez l'un d'entre eux dans des conditions normales : Stylonychia mytilus. Celui-ci, grâce à la présence de plusieurs groupes d'organelles que l'on peut facilement distinguer les uns des autres, se prête très bien à l'étude des mouvements ciliaires, comparée à celle du comportement.

C'est ainsi que Machemer put mettre en évidence une grande diversité de mouvements, même en ce qui concerne l'inversion ciliaire au sujet de laquelle il ne put constater d'apparence stéréotypée, mais qu'il sépara en deux composantes; une inversion arrière et une inversion avant pouvant apparaître soit associées dans un sens ou dans l'autre, soit isolément.

Les différences entre l'"avoiding reaction" de Paramecium et l'inversion ciliaire complexe de Stylonychia mytilus nous ont amené à nous poser la question de savoir dans quelle mesure le contrôle ionique de ces réactions était identique.

PREMIERE PARTIE : Phenomène de Gibbs-Donnan

Matériel et méthodes

Les cultures de Stylonychia mytilus qui nous ont été fournies par le laboratoire de protistologie de l'Université de Genève, (Prof. G.de Haller) sont maintenues dans du Pringsheim avec ou sans terre et nourris de Chlorogonium.

Afin de garder des conditions de développement et de multiplication convenable, les milieux de culture sont partiellement remplacés tous les deux jours par des milieux frais, les animaux sont repiqués tous les dix jours et la température est maintenue à une valeur de $17 \pm 1^{\circ} \text{C}$ degrés.

L'enregistrement macrophotographique des mouvements se fait par la méthode de Fergusson (1957) modifiée par Dryl (1958). Cette méthode consiste à placer une large goutte (5 ml) de milieu test contenant des ciliés sur une plaque de verre (50 cm^2 de surface). Deux faisceaux lumineux, dirigés obliquement de bas en haut, et à travers des filtres de température, sur cette plaque de verre, donnent un éclairage sur fond noir de la préparation. Une caméra photographique est montée verticalement au dessus de la plaque sur un support qui permet de régler la distance entre caméra et plaque. Dans ces conditions, les ciliés apparaissent comme des point lumineux et les traces relevées sur le film représentent le mouvement de l'animal pendant la durée de l'exposition.

Une autre méthode d'enregistrement des mouvements, cette fois au niveau microscopique, a consisté à déposer l'animal dans une chambre à perfusion recouverte d'une lamelle contre laquelle il était

immobilisé à l'aide de deux microaiguilles. De cette façon, les modifications du milieu peuvent se faire directement dans la chambre, sans déplacer l'animal.

L'observation se fait sous microscope normal, monté avec un tube photo permettant des prises de vue instantanées de l'animal. Grâce à une intensité d'éclairage du microscope suffisamment élevée, nous avons pu abaisser la durée d'exposition à $1/250^{\text{ème}}$ de seconde. Dans certaines circonstances, cette durée reste encore trop élevée. Nous avons alors du pallier à cet inconvénient par l'utilisation de méthodes d'observation indirectes, c'est à dire, par l'introduction de particules dans le milieu, ou par l'étude du sens des ondes ciliaires métachrones traversant la surface du cilié.

Resultats

Les Stylonychia mytilus, préalablement adaptés à un milieu contenant 1 mM CaCl_2 et 0,5 mM Tris, sont plongés dans des séries de solutions de concentrations variables en potassium et en calcium. Nous obtenons alors une valeur limite de la relation $[\text{K}^+] / [\text{Ca}^{++}]$ qui induit l'inversion des membranelles adorales et des cirres somatiques. Cette valeur, exprimé par le rapport $[\text{K}^+] / \sqrt{[\text{Ca}^{++}]}$, reste constante (environ 6 - 8) quelles que soient les concentrations absolues des ions en présence, ce qui concorde parfaitement avec le principe de Gibbs - Donnan (Tableau I).

En dessus de cette valeur limite, les modalités de l'inversion se présentent d'une façon invariable pour toutes les valeurs du rapport de Gibbs - Donnan : c'est à dire, une spirale arrière gauche dont le rayon diminue progressivement au cours de la première minute, puis l'animal tourne sur lui-même selon une vitesse de rotation de plus en plus faible jusqu'à arrêt complet. (fig. 1.) Dès cet instant, il n'apparaît plus que quelques réactions rares et sporadiques. L'animal ne répond plus à aucun stimulus mécanique, chimique ou électrique et ne présente plus de réactions d'évitement. Cependant il ne meurt pas, et replongé dans son milieu normal, il retrouve très rapidement son comportement habituel.

La constance de cette réponse, comparée aux observations faites sur Paramecium par Jahn (1962),

TABLEAU I

Inversion ciliaire de Stylonychia mytilus induite par l'augmentation du rapport $[K^+] / \sqrt{[Ca^{2+}]}$ dans la solution extérieure.

Gibbs - Donnan ratio $[K^+] / \sqrt{[Ca^{2+}]}$

$Ca^{++} \backslash K^+$	1	2	2.5	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16	20	24	32	$[K^+] / \sqrt{[Ca^{2+}]}$
0,125	N	PCR	CCR														5,7 - 7,1
0,25			N	PCR	CCR												6 - 8
0,5				N	PCR	CCR											5,7 - 7,1
1,0						N	PCR	CCR									6 - 7
2,0									N	PCR	CCR						7,1 - 8,5
4,0										N	PCR	CCR					6 - 7
8,0												N	CCR PCR	CCR			5,7 - 7,1
16,0													N	CCR PCR	CCR		5 - 6

N = mouvement ciliaire normal
 PCR = inversion ciliaire périodique
 CCR = inversion ciliaire complète

Les concentrations de K^+ et Ca^{++} sont indiquées en mM / litre.

Pour les valeurs du rapport supérieures à 8, l'inversion complète apparaît toujours, pour les valeurs inférieures à 5,7, les mouvements restent normaux.

Figure 1. Enregistrement macrophotographique du chemin parcouru par Stylonychia pendant une durée de 5 sec.

A Mouvement normal dans un milieu ne contenant que 1 mM CaCl_2 .

Les tracés montrent une grande variété de mouvements possibles :

immobilisation : punctiforme (1)

nage en avant rapide : tracés courbe de grand rayon (2)

nage en avant lente : tracés rectilignes (3)

inversion ciliaire périodique : tracés en forme de croix (4)

inversion ciliaire complète : tracés courbes de faible rayon (5)

B Inversion complète après 15 secondes d'exposition à une solution dont le rapport $[\text{K}^+] / \sqrt{[\text{Ca}^{++}]}$ est supérieur à 8. Tous les animaux sont en inversion complète.

C Idem après 1 minute d'exposition. Le rayon de la spirale est nettement diminué.

D Idem après 5 minutes d'exposition. Les mouvements sont réduits à une rotation lente des animaux sur eux-mêmes.

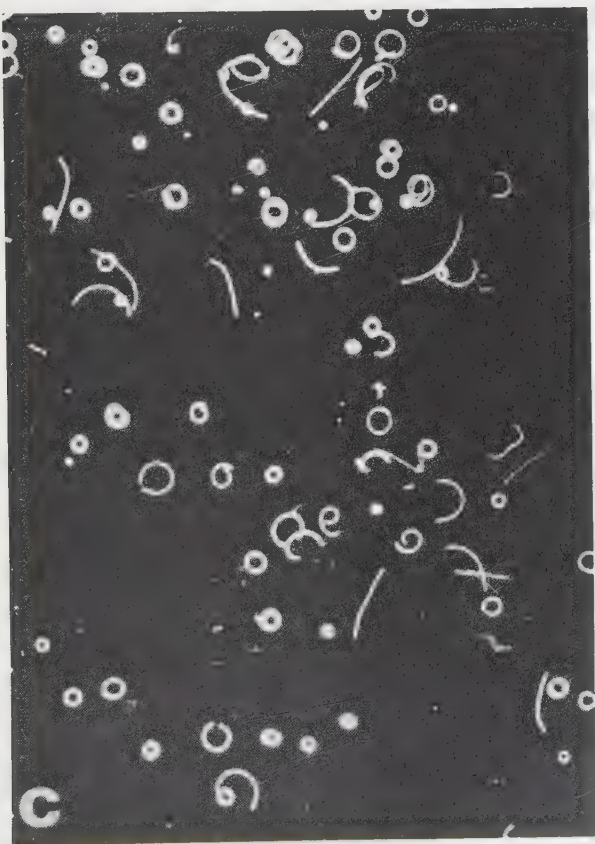
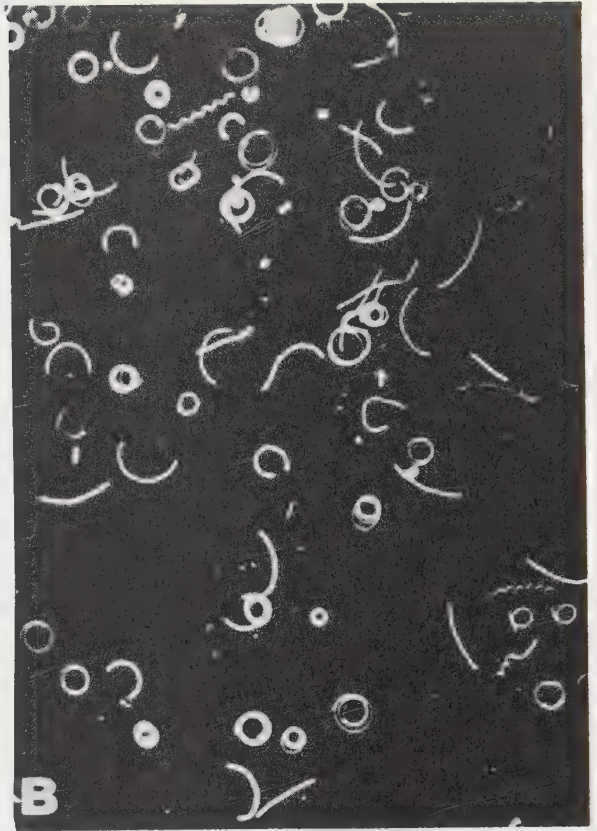
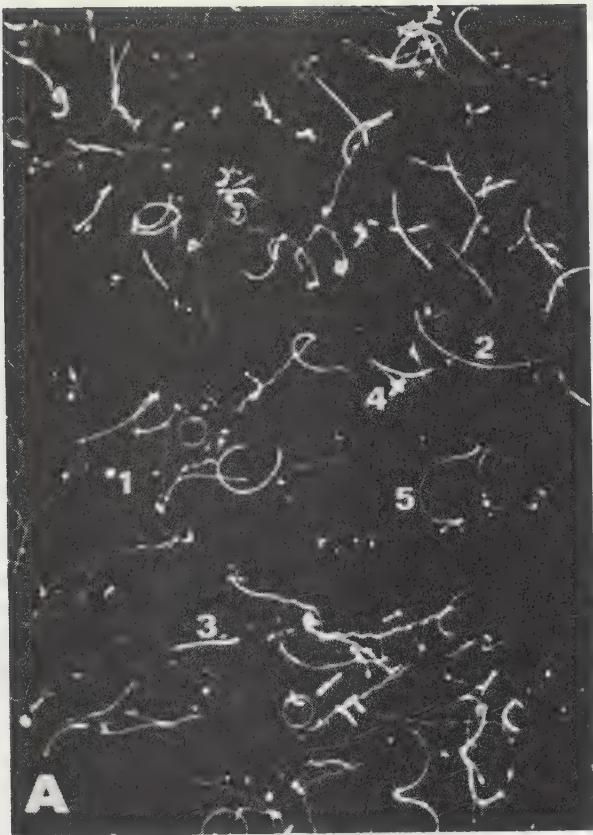


Fig. 1

Grebecki (1965) et Naitoh (1968), nous a incité à pousser l'observation au niveau des oraganelles locomotrices afin de voir si leur coordination présente des variations temporelles en relation avec les variations du rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$.

Nous avons ainsi pu déterminer trois phases dans le temps (Tableau II).

Au cours de chacune de ces phases, nous nous proposons d'étudier plus particulièrement le comportement de quatre groupes d'organelles. Les membranelles adorales, les cirres frontaux, les cirres marginaux droits, et les cirres marginaux gauches. (fig. 2).

Phase I (fig. 3B)

Cette phase dure de 60 à 70 sec. Elle correspond probablement de très près au type de mouvements décrit par Machemer dans son étude sur les mouvements de Stylonychia mytilus lors d'une inversion provoquée par un stimulus de longue durée. Bien qu'une certaine difficulté d'observation, due à la rapidité et à la fréquence très élevée des mouvements, nous interdit d'être absolument catégorique quant à l'interprétation, l'introduction de particules dans le milieu nous permet de reconstituer le sens probable des mouvements.

Ainsi, pendant toute cette première période, les membranelles adorales sont inversées, leur mouvements sont dirigés dans une direction identique à celle que l'on observe pour une inversion spontanée.

Tous les cirres ventraux et marginaux sont aussi en position inversée. Les courants provoqués par leurs mouvements sont dirigés vers l'avant. La fréquence

TABLEAU II

Modification du comportement du système locomoteur de Stylonychia au cours du temps lors d'une stimulation induite par l'augmentation du rapport de Gibbs-Donnan.

TABLEAU RESUME

Group	AZM (15)	RMC (20)	FC (6)	LMC (15)	Frequency
Phase I 0 - 70"	CR	CR	CR	CR - PaR	+++
Phase II 60 - 80"	PaR	CR	CR	N	↘
Phase III 80-150"	N	CR	CR	N	↘↘

AZM = zone de membranelles adorales; RMC = cirres marginaux droits; FC = cirres frontaux; LMC = cirres marginaux gauches.

Au cours de la première phase, seuls les cirres marginaux gauches ne conservent pas le mouvement d'inversion complète, alors que les cirres marginaux droits et frontaux le conservent pendant toute la durée de la stimulation. La fréquence diminue dans tous les groupes d'organites.

CR = inversion complète; PaR = inversion partielle; N = mouvements "normaux", c'est à dire dont l'activité tend à propulser l'animal vers l'avant.

Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre d'animaux étudiés.

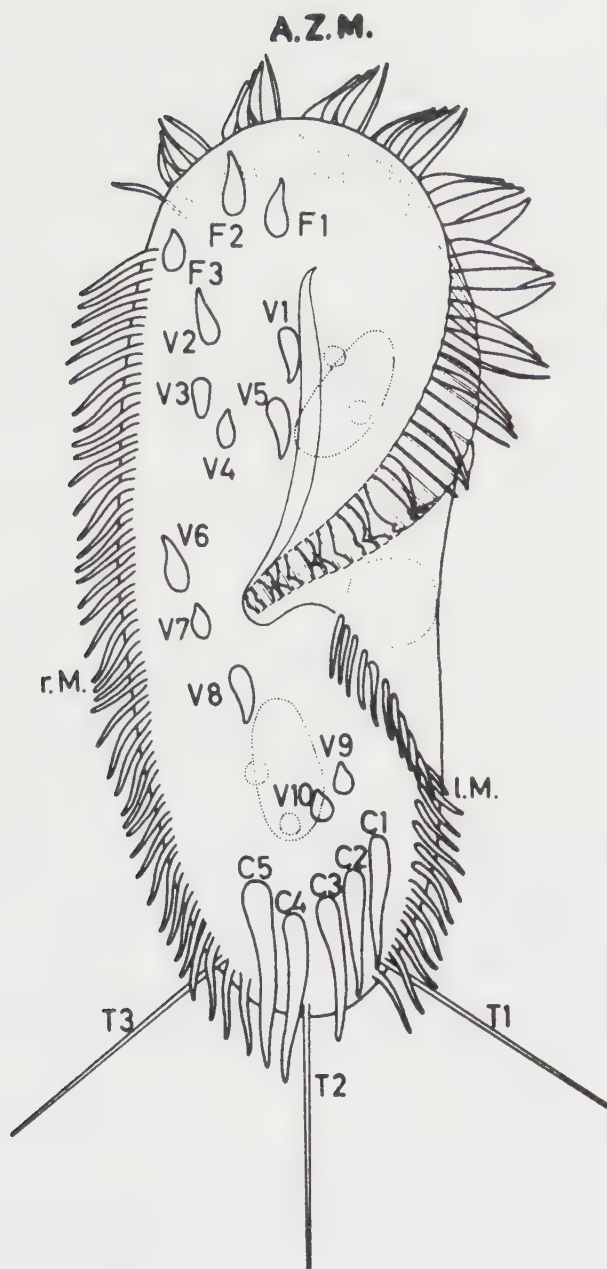


Fig. 2. Schéma de l'appareil ciliaire de Stylonychia mytilus (d'après Machemer; 1965). Les groupes auxquels nous nous sommes intéressés sont: AZM (zone de membranelles adorales) constitués de cils disposés en lamelle, dont le rôle est d'attirer les particules nutritives vers le cytostome; r.M. (ou RMC, cirres marginaux droits); F (ou FC, cirres frontaux); l.M. (LMC, cirres marginaux gauches).

D'autres groupes peuvent cependant être observés: V (cirres ventraux); C (cirres caudaux); T (cirres terminaux).

de leur battement, très élevée au début, diminue progressivement au cours du temps, de telle sorte qu'à la fin de cette période, on peut observer leur position.

Les cirres frontaux ont une position très caractéristique de ce type d'inversion et qu'ils conservent aussi longtemps que l'animal reste dans le milieu potassium. Dirigés vers l'avant, ils présentent une courbure dont la convexité se trouve sur la gauche de l'animal.

Les cirres marginaux droits sont en position d'inversion, la base du cirre dirigé vers l'avant, la pointe vers l'arrière. Une onde métachrone les traverse d'arrière en avant.

Quant aux cirres marginaux gauches, le mouvement des particules nous permet de constater, qu'ils sont en position d'inversion au début de la phase. Mais des modifications apparaissent au cours du temps qui tendent à changer la direction des battements.

Phase 2 (fig. 3C)

Cette phase dure de la 60^{ème} à la 80^{ème} seconde. L'activité des cirres frontaux et marginaux droits n'est pas modifiée, sauf en ce qui concerne la rapidité et la fréquence des mouvements qui diminuent considérablement.

En revanche, les modifications au niveau des marginaux gauches se concrétisent sous la forme d'une normalisation des mouvements.

Leurs battements sont dirigés vers l'arrière et les ondes métachrones qui les traversent vont de l'avant

Figure 3 a) Enregistrement microphotographique de Stylonychia mytilus lors d'une stimulation potassique.

- A Avant le passage dans la solution de stimulation.
L'appareil locomoteur est au repos. Seules les membranelles sont en activité.
- B 15 secondes après l'échange du milieu. Tous les cirres sont en inversion, mais la fréquence de leur mouvement est trop élevée pour que l'on puisse observer autre chose que la présence d'ondes métachrones qui courent le long de la surface de l'animal.
- C 1 minute après l'échange du milieu. La fréquence est encore très élevée, mais les ondes métachrones sont encore bien visibles, surtout au niveau des cirres marginaux droits.
- D 5 minutes après l'échange du milieu. La fréquence des battements est très faible et permet d'observer la position caractéristique des cirres dans ces conditions. Les membranelles sont très actives dans le sens initial. Les cirres marginaux droits sont incurvés vers l'avant, alors que les gauches le sont vers l'arrière. Les frontaux sont incurvés vers la gauche en position très différente de la position normale (en A).

Figure 3 b) Schéma des figures précédentes. Les flèches sur les côtés de l'animal indiquent le sens des mouvements actifs des cirres. Les flèches au centre indiquent la direction et le sens du mouvement résultant.

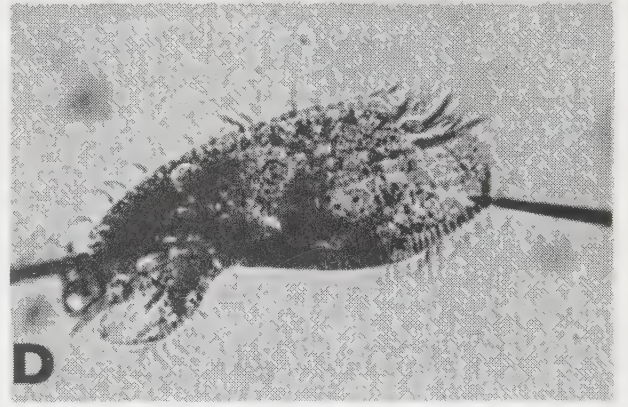
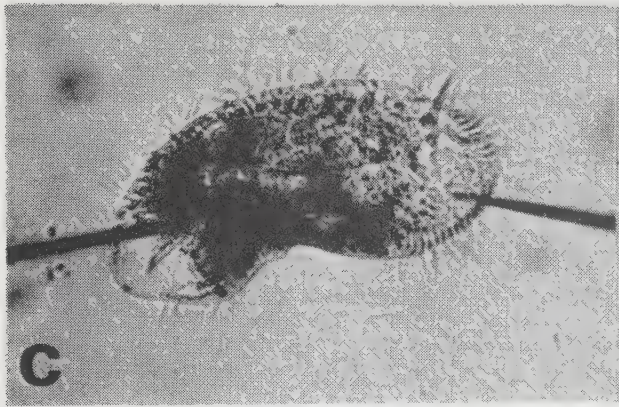
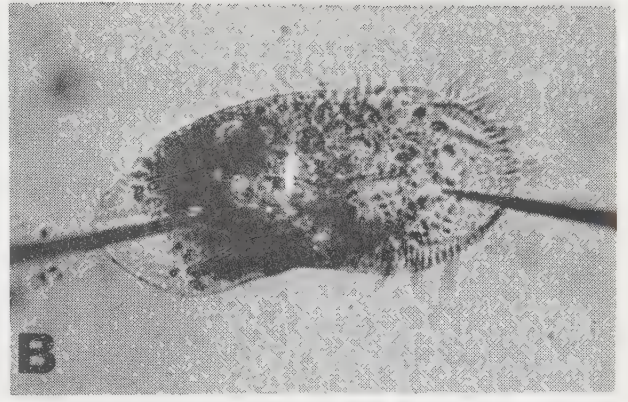
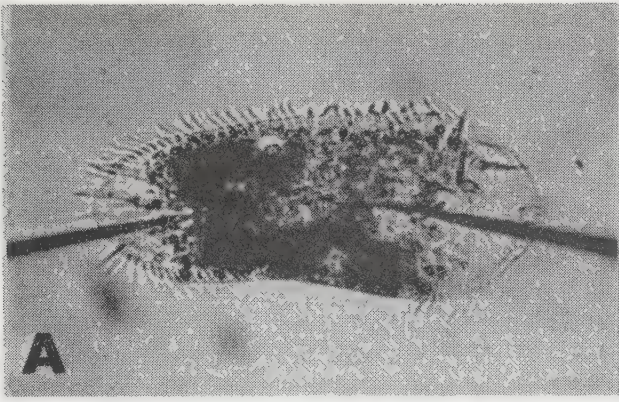
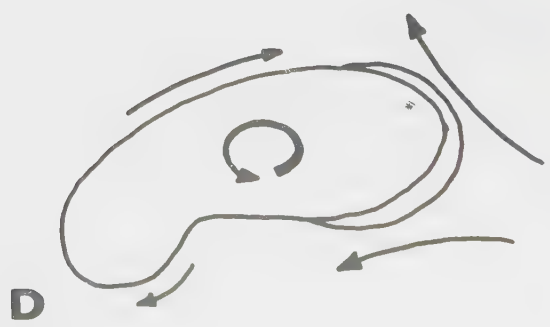
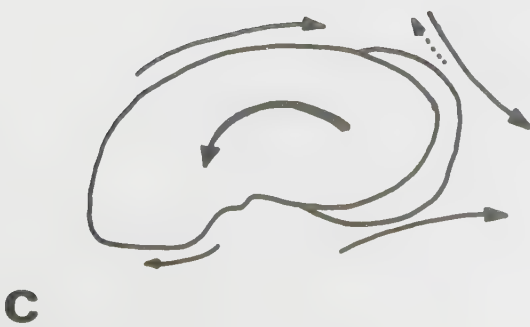
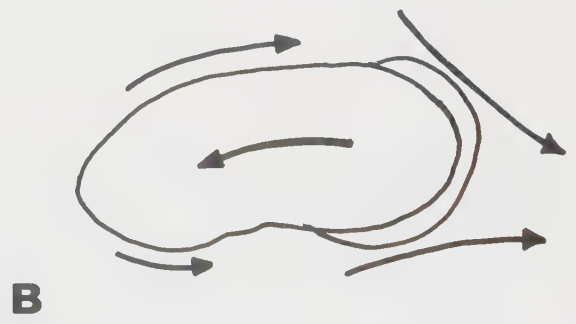
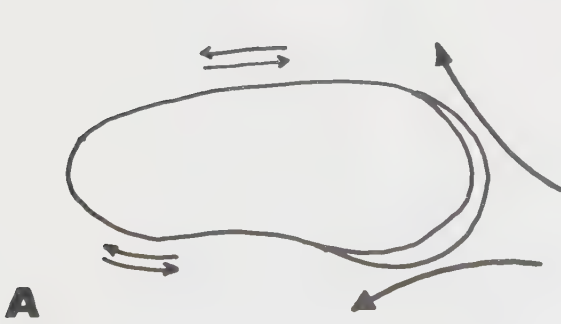


Fig. 3



vers l'arrière.

Quant aux membranelles adorales, elles sont toujours inversées, mais il apparaît une certaine turbulence dans leurs mouvements, qui prend son origine dans la partie droite des membranelles et s'étend de proche en proche sur toute la surface.

Phase 3 (fig. 3D)

Pendant cette phase, qui dure de 80 à 180 secondes, les mouvements des cirres corporels ne sont plus modifiés quant à leur direction, seule leur fréquence et leur vitesse continuent à diminuer. Les mouvements des membranelles cependant se normalisent définitivement, et le sens de leur battement redevient celui d'un animal dans son milieu normal.

Sous cet aspect, l'animal peut continuer à vivre plusieurs heures sans qu'aucune modification n'intervienne plus.

Ces observations effectuées pour deux valeurs différentes du rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ (16 et 32) montrent aussi une invariance du phénomène.

Le principe de Gibbs - Donnan, c'est à dire la loi d'action de masse, reste donc valable pour Stylonychia comme pour Paramecium. Cependant une différence importante apparaît entre les deux comportements puisque Stylonychia présente un seuil de réponse à la stimulation potassique en dessus duquel le phénomène ne varie plus, c'est à dire un système de comportement tout ou rien, ce qui n'est pas le cas pour Paramecium, pour laquelle le même stimulus provoque une inversion ciliaire toujours temporaire, et c'est la durée de

cette inversion qui dépend du rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ (Jahn 1962). L'hypothèse selon laquelle la durée de l'inversion est en rapport avec le temps pendant lequel une quantité de calcium suffisante pour activer le système contractile est libérée (Naitoh 1968) ne peut donc pas être appliquée à Stylonychia. De nouvelles hypothèses devaient être formulées. C'est pourquoi nous avons été amené à considérer un nouveau paramètre en rapport direct avec l'excitabilité cellulaire : le potentiel de membrane.

En effet, déjà sur d'autres ciliés l'étude des propriétés électriques de la membrane a permis de mettre en évidence de nouvelles et importantes données sur l'inversion ciliaire considérée du point de vue de l'excitation cellulaire. Kamada (1934), en véritable pionnier de la physiologie de protozoaires ciliés, a le premier démontré par le moyen de microélectrodes intracellulaires, la présence d'un potentiel électrique transmembranaire, et prouvé qu'il était dépendant des concentrations externes de cations. Par la suite de nombreux auteurs, appartenant plus particulièrement à l'école japonaise, se sont intéressés avec succès à l'étude des potentiels de membrane de protozoaires.

C'est ainsi qu'ils ont remarqué chez tous les protozoaires étudiés, que ce soit chez Opalina (Kinosita 1954, Ueda 1961), chez Paramecium (Yamaguchi 1960), chez Noctiluca (Hisada 1957), ou chez Amoeba proteus (Bingley 1966), l'existence d'un potentiel transmembranaire dont les valeurs sont semblables à celles trouvées dans d'autres cellules d'origine différente.

Une des observations les plus intéressantes dans ce domaine est la démonstration du parallélisme entre le potentiel de membrane et la direction du battement

ciliaire. Yamaguchi (1960) chez Paramecium, Kinosita (1954) et Naitoh (1958) chez Opalina, ont en effet montré que l'inversion ciliaire est toujours accompagnée d'une dépolarisation de la membrane, alors que l'augmentation du mouvement normal (Yamaguchi 1960) ou la contraction spontanée de l'ectoplasme (Kinosita et al. 1964) chez Paramecium est accompagnée par une hyperpolarisation.

Nous avons donc mis au point une méthode de mesure électrophysiologique afin d'étudier le potentiel de membrane et ses variations chez Stylonychia.

DEUXIEME PARTIE : Investigations électrophysiologiques

Méthodes

Les mesures de potentiels se font dans une chambre de plexiglas dont le fond a été enlevé et remplacé par une lamelle de verre. Cette chambre est aménagée de façon à pouvoir recevoir deux électrodes de stimulation constituées de fil de platine de 0,5 mm de diamètre, une électrode indifférente constituée d'un pont agar reliant les solutions à la terre par l'entremise d'un fil d'argent chloruré et un système d'écoulement permettant l'échange rapide des solutions. Elle est déposée sur la platine d'un microscope inversé Wild M 40 qui présente par rapport au microscope normal l'avantage d'avoir une source lumineuse au dessus de la préparation et suffisamment éloignée pour éviter les problèmes d'échauffement.

Deux micromanipulateurs Leitz permettent d'introduire l'un une microaiguille ($\phi \sim 1\mu$) avec laquelle l'animal est maintenu en place, l'autre, une microélectrode d'enregistrement. Cette microélectrode est constituée d'un tube de verre Pyrex étiré de façon à obtenir une pointe d'un diamètre inférieur à 0,5 μ et elle est remplie de KCl 0,5 M. Sa résistance varie de 50 à 80 M Ω et son potentiel de pointe ne dépasse pas 5 mV.

L'ensemble du système est placé dans une cage de Faraday, sur une table stabilisée.

La technique consiste à prélever quelques spécimens de Stylonychia mytilus, cultivés dans les mêmes conditions que précédemment, et à les plonger avec le minimum de Pringsheim possible dans une solution de 1 mM CaCl_2 , 1 mM KCl et 5 mM Tris (pH 7,2) à

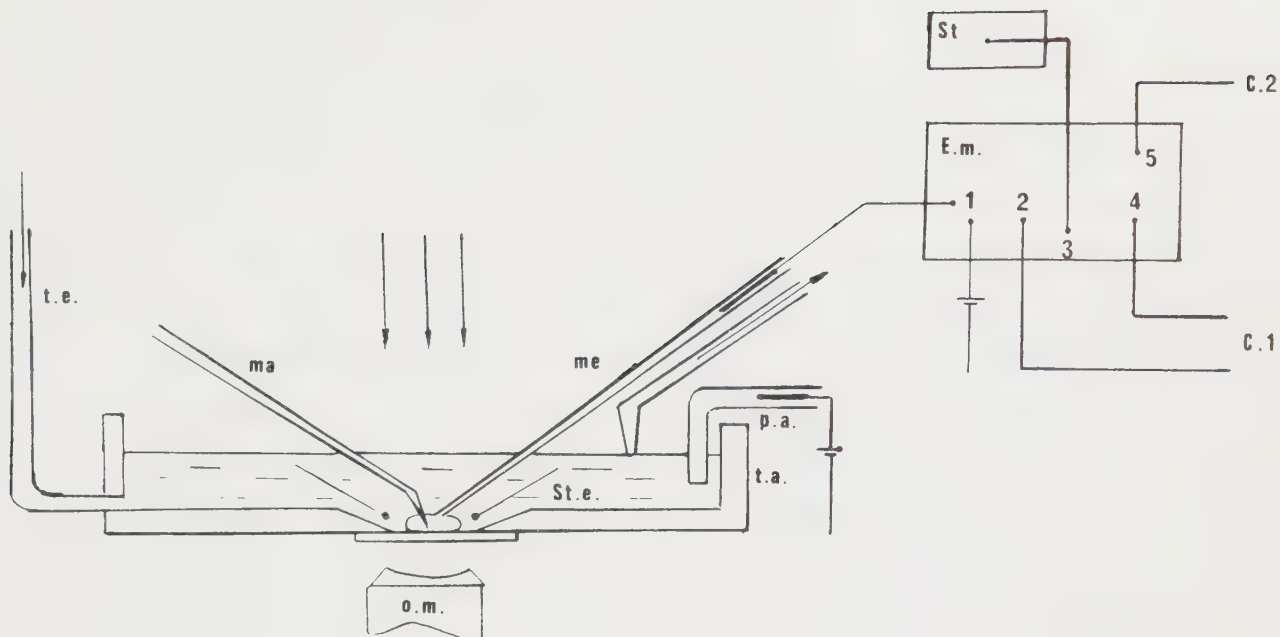


Fig. 4 Appareillage d'investigation électrophysiologique. La solution test est introduite dans la chambre d'expérience par le tube d'écoulement (t.e.) et aspiré par succion. Le spécimen est retenu au fond de la chambre par une microaiguille (ma) et la microélectrode (me). E.m., changeur d'impédance relié à la microélectrode d'enregistrement (1), au canal 1 de l'oscilloscope (2 et 4), au stimulateur (St) permettant le passage de courant par la microélectrode (3) et au canal 2 (C.2) de l'oscilloscope (5) pour permettre d'étalonner ce courant. St.e., électrodes de stimulation externes. p.a. pont agar de mise à terre. o.m. objectif du microscope.

laquelle est ajoutée 1 % de méthylcellulose (4000 cP) afin de ralentir les mouvements. Après 15 minutes d'adaptation, ils sont à nouveau prélevés et déposés dans la chambre de mesure sur une mince couche d'agar.

Sous observation microscopique, un individu de taille moyenne (200 - 300 μ de longueur) est fixé contre la couche d'agar au moyen de la microaiguille placée au centre de la cellule. La chambre est alors remplie de solution test portée à un volume de 2 ml. Comme les solutions test ne contiennent pas de méthylcellulose, afin d'en faciliter l'échange et d'éviter des problèmes de viscosité, les cirres retrouvent toute leur activité et leur force. Or cette force est telle que s'ils sont en contact avec un milieu solide, l'animal est capable de s'arracher de la microaiguille, quitte même à se couper en deux parties. Pour cette raison, nous avons été amené à fixer les individus étudiés en "décubitus" dorsal.

Dans cette situation, la microélectrode est implantée dans la partie antérieure dorsale de la cellule. Les potentiels mesurés sont transmis par l'entremise d'un changeur d'impédance (W-P instrument M-4A) à un oscilloscope (Tektronix) pour l'enregistrement photographique et à une table traçante (Devices) pour la lecture directe.

De plus deux stimulateurs permettent de passer du courant soit par les électrodes externes, soit au moyen du M-4A directement à travers la microélectrode d'enregistrement.

Toutes les expériences ont été faites à température ambiante (20 - 22°C).

Résultats

1) Potentiel de membrane

a) Potentiel de repos et ses modifications spontanées (fig. 5).

La pénétration de la microélectrode à travers la membrane de Stylonychia placé dans un milieu contenant 4 mM CaCl_2 , 2 mM KCl et 5 mM de tampon Tris (pH 7,2) est accompagnée de l'apparition soudaine d'une différence de potentiel de 30 - 35 mV, négative par rapport au milieu extérieur. Ce potentiel n'est pas stable, mais soumis à des fluctuations irrégulières de quelques millivolts, au sujet desquels il n'a pas été possible d'observer une correspondance avec des activités mécaniques.

Cependant, des modifications beaucoup plus importantes du potentiel, consistant en une diminution transitoire du potentiel de membrane dont le maximum atteint -10 ± 3 mV et d'une durée de 600 à 800 m sec., s'observent occasionnellement. Si cette dépolarisation correspond toujours à un mouvement d'inversion ciliaire de l'animal, il faut cependant remarquer qu'elle n'est pas uniforme. En effet, elle se présente généralement sous l'aspect d'une onde monophasique formée de trois constituants :

Une dépolarisation lente, de faible amplitude (3 - 4 mV) et de 2 à 300 m sec., suivie d'un pic dépolarisation - repolarisation rapide (150 - 200 m sec. pour 18 - 22 mV) et se terminant par une repolarisation lente, elle aussi.

Mais, si le pic rapide est toujours présent, l'une ou l'autre phase lente peut être remplacé par une

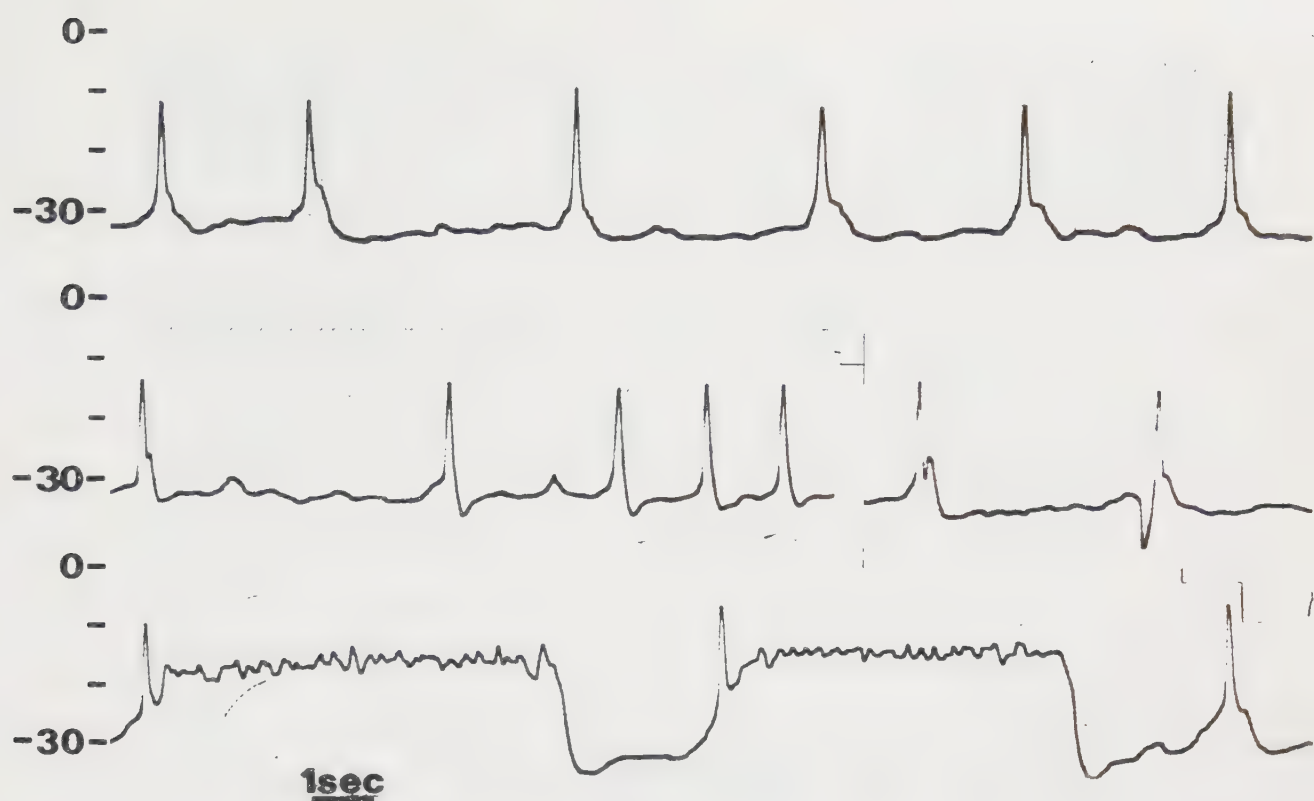


Fig. 5 Potentiels d'action spontanés de Stylonychia mytilus : Tracé du haut, potentiels brefs sans hyperpolarisations . Tracé du milieu, potentiels brefs avec hyperpolarisations suivants ou précédents la dépolarisation. Tracé du bas, potentiels brefs suivis de plateau de longue durée.

hyperpolarisation, donnant à l'onde un aspect diphasique, soit que l'hyperpolarisation suive la dépolarisation, ce qui est un cas relativement fréquent, soit qu'elle la précède, lequel cas est très rare.

De plus, la repolarisation rapide peut n'être pas complète, elle est alors suivie d'un plateau, dont la durée peut varier de 1 à plusieurs secondes, et au cours duquel la polarité est maintenue à une valeur moyenne de -15 ± 2 mV. Ce plateau se termine par un retour soudain au potentiel initial.

Enfin, on observe parfois un pic d'hyperpolarisation isolé qui peut atteindre jusqu'à -50 mV.

Ainsi, nous constatons que la diversité des modifications du potentiel de Stylonychia correspond bien à la diversité des mouvements observés par Machemer (1965, 1969, 1970), et que même s'il nous a été techniquement impossible d'observer simultanément les deux fonctions, nous pouvons très vraisemblablement établir un parallèle entre elles.

b) Modification du potentiel de membrane provoquée par une stimulation électrique.

La stimulation par électrode externe aussi bien que la stimulation par courant sortant sont capables de provoquer une réponse sous forme d'une inversion de la nage de l'animal, associée à une dépolarisation de la membrane, même dans un milieu ne contenant que du CaCl_2 .

Cette propriété de la membrane de Stylonychia mytilus est intéressante si l'on se souvient que Kinosita et al. (1964) ont montré qu'il leur était impossible de provoquer une modification du potentiel de membrane

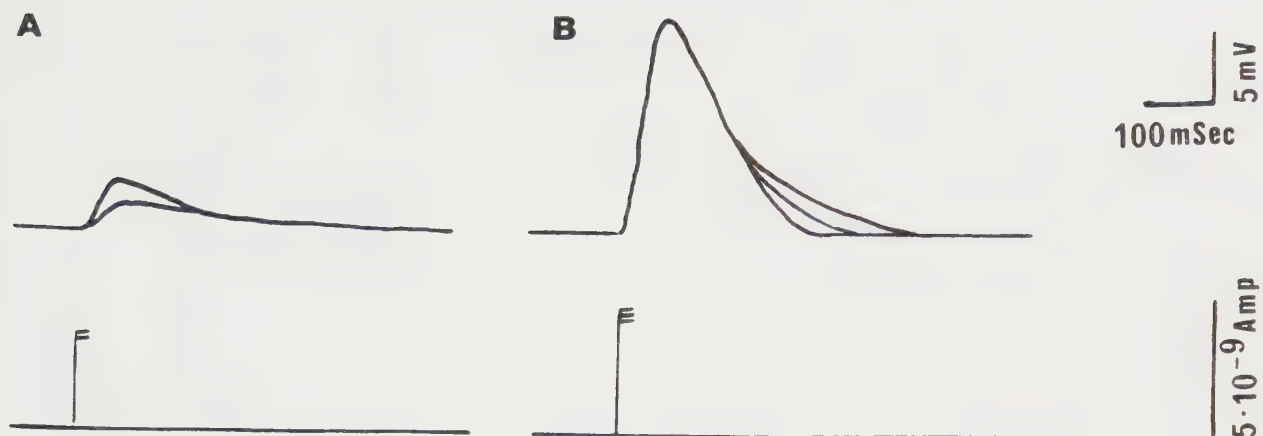


Fig. 6. Variations de potentiels en réponse à un stimulus bref.

A Stimuli infraliminaire. Faibles réponses d'amplitudes proportionnelles à l'intensité du stimulus.

B Stimuli supraliminaire. Toutes les réponses sont d'amplitude identique.

sous l'effet d'une stimulation brève par électrodes externes, même si l'intensité en était suffisante pour provoquer une réponse ciliaire prononcée. De leur côté, Naitoh et Eckert (1967) ont observé qu'un stimulus de courant sortant induit chez Paramecium, plongée dans un bain ne contenant que du CaCl_2 ou du CaCl_2 et du KCl , une dépolarisation dont l'amplitude graduée est une fonction de l'intensité du courant appliqué.

Or, dans notre cas, nous constatons que si la stimulation élimine bien entendu la phase initiale de dépolarisation lente, les autres caractéristiques de la dépolarisation provoquée sont semblables à celles d'une dépolarisation spontanée.

La réponse électrique de la cellule à des stimuli de durée brève (1 m sec.) montre en effet que de faibles intensités provoquent de légères dépolarisations, de même en amplitude que les fluctuations du potentiel de repos et dont l'intensité varie en fonction du courant appliqué. (fig. 6a).

L'augmentation de l'intensité du stimulus permet d'atteindre un niveau de dépolarisation critique au dessus duquel la réponse apparaît comme un tout ou rien. Cette réponse seule correspond au mouvement d'inversion de l'animal. (fig. 6b).

Des stimulations par courant sortant de plus longue durée (300 m sec.) permettent de mettre en évidence le fait que la latence de la réponse en tout ou rien devient plus courte pour des intensités plus élevées, ce qui indique bien la présence d'un seuil de réponse. (fig. 7).

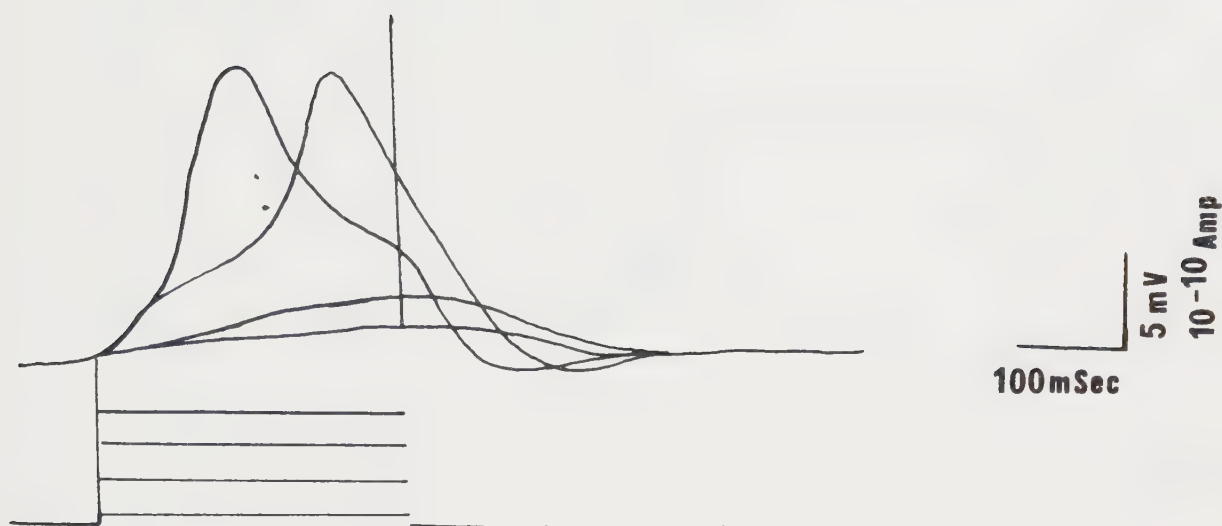


Fig. 7 Réponse électrique de Stylonychia mytilus à un stimulus de courant sortant (300 m sec) d'intensité variable dans une solution de 1 mM de CaCl_2 . En dessus du seuil, la latence de la réponse diminue pour une augmentation de l'intensité du stimulus.

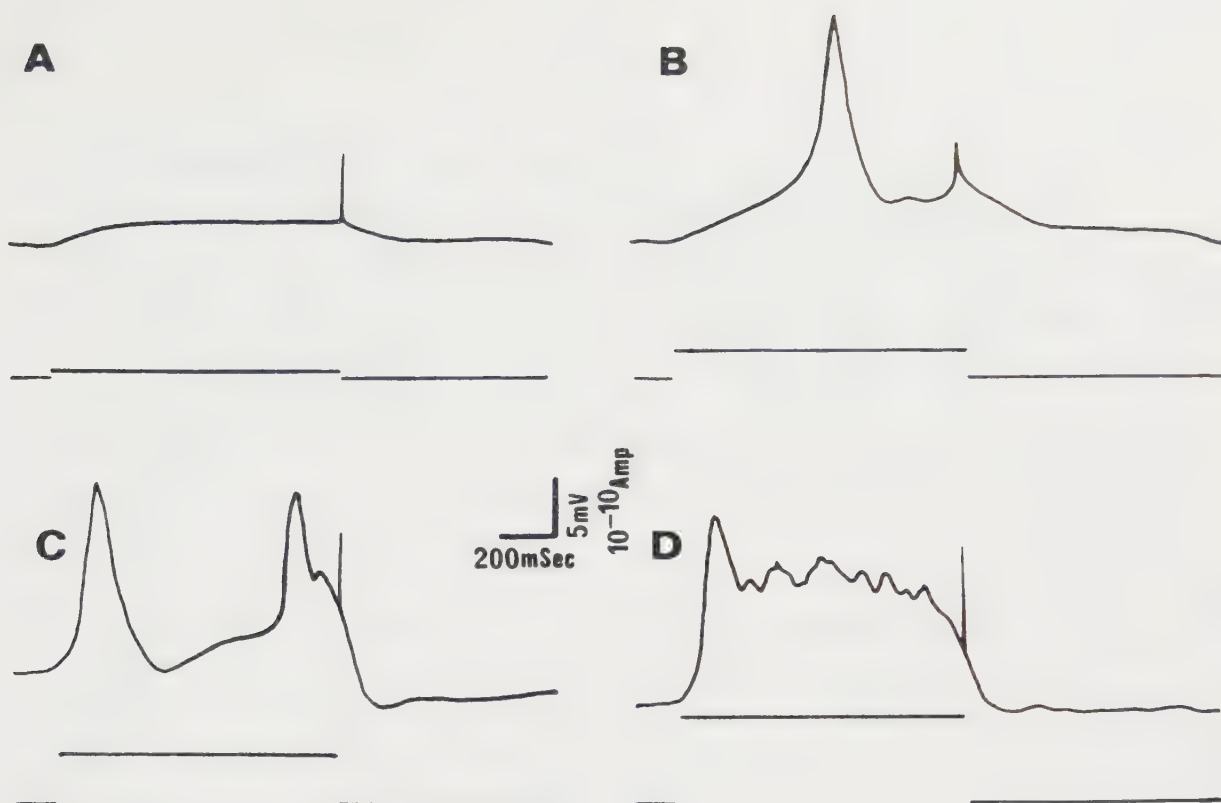


Fig. 8 Réponses répétées et plateau chez Stylonychia mytilus en réponse à un stimulus de très longue durée (1 sec). L'intensité du courant augmente progressivement de A à D. Une intensité supraliminaire faible permet d'obtenir un PA unique (B) ou plusieurs (C), mais seulement à de très basses fréquences, l'augmentation du courant transforme ces réponses en un plateau qui dure aussi longtemps que passe le courant (D).

Des potentiels d'action répétitifs peuvent être induits par un stimulus de plus longue durée encore. Leur fréquence augmente parallèlement à l'intensité du courant, mais seulement dans une zone très étroite au dessus de laquelle la repolarisation n'est plus complète, mais suivie d'un plateau semblable à celui observé lors d'une dépolarisation spontanée. Ce plateau est maintenu aussi longtemps que passe le courant. (fig. 8).

Il est à noter cependant que si ces potentiels de dépolarisation sont du type tout ou rien, aucun ne présente d'"overshoot", c'est à dire que l'on n'observe pas d'inversion même transitoire du potentiel de membrane comme c'est généralement le cas des cellules excitables lors d'un potentiel d'action.

2) Effet de la variation du rapport des concentrations Potassium-Calcium dans la solution externe

Nous avons déjà montré l'importance du rapport des concentrations des ions Potassium et Calcium dans le comportement de Stylonychia mytilus. (voir page 8). D'autre part nous avons démontré que même en solution de CaCl_2 seul, il est capable de présenter une inversion ciliaire étroitement associé à un potentiel d'action tout ou rien. Il est donc probable que l'excitation d'une telle cellule est couplée à un mécanisme de transport calcique. Sur la base de ces observations, nous nous sommes intéressés aux influences que peuvent exercer les ions Ca et K sur les propriétés électriques de la membrane de Stylonychia.

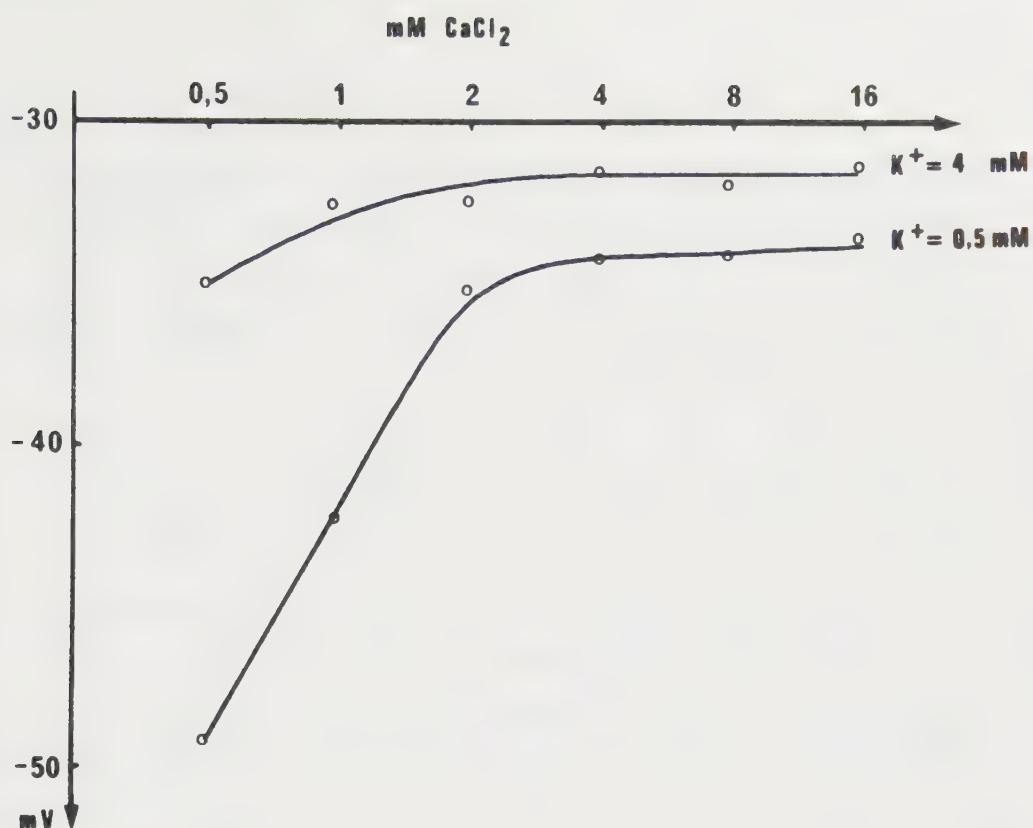


Fig. 9 Potentiel de repos en fonction de la concentration de CaCl_2 dans la solution externe, pour deux valeurs différentes de la concentration de potassium (0,5 mM; 4 mM). L'influence des variations ioniques est beaucoup plus importante pour les faibles concentrations que pour les fortes. Chaque point représente la moyenne de cinq mesures faites sur des animaux différents.

a) sur le potentiel de repos (fig. 9)

Le potentiel de repos de Stylonychia mytilus est dépendant aussi bien de la concentration externe de K^+ que de celle de Ca^{++} . Cet effet est démontré par l'examen des potentiels de trois séries de concentrations potassiques en fonction du log. $[Ca^{++}]$.

Pour de faibles concentrations (entre 0,5 et 2 mM de $CaCl_2$) le potentiel diminue exponentiellement par rapport à la concentration externe de calcium.

Cette dépolarisation est d'autant plus importante que la concentration de potassium est faible, passant de 24 mV pour une augmentation de $[Ca^{++}]$ de dix fois dans le cas de $[K] = 0,5$ mM, à seulement 4,5 mV pour la même augmentation dans le cas de $[K] = 4$ mM. Pour de plus fortes concentrations, par exemple à partir de 4 mM de $CaCl_2$, l'influence d'une variation des concentrations devient pratiquement négligeable et le potentiel de repos ne varie plus.

De plus, l'augmentation de la force ionique diminue le potentiel de membrane même pour des valeurs constantes du rapport de Gibbs - Donnan.

b) sur l'excitabilité (fig. 10)

De même que le potentiel de repos, l'excitabilité de la cellule est modifiée par des variations des concentrations ioniques externes. L'étude des mêmes concentrations que dans l'expérience précédente en relation avec l'intensité de la stimulation extracellulaire (V/cm) nécessaire à provoquer l'inversion des organelles locomotrices montre une influence prépondérante du calcium.

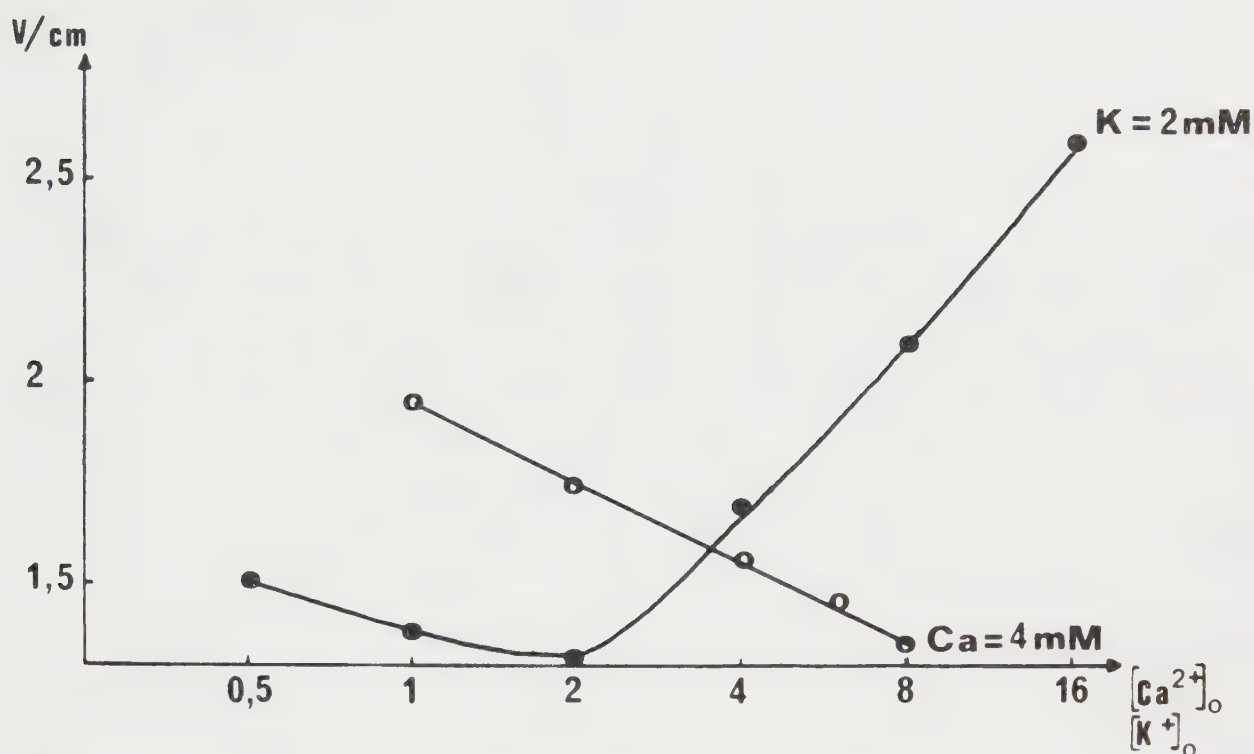


Fig. 10 Influence de Ca et de K sur l'excitabilité de Stylonychia mytilus. L'excitabilité diminue pour une augmentation de calcium à potassium constant (courbe des points pleins), elle augmente pour une augmentation de potassium à calcium constant (courbe des cercles vides). Chaque point représente la moyenne de cinq séries de mesures effectuées sur un minimum de 10 animaux.

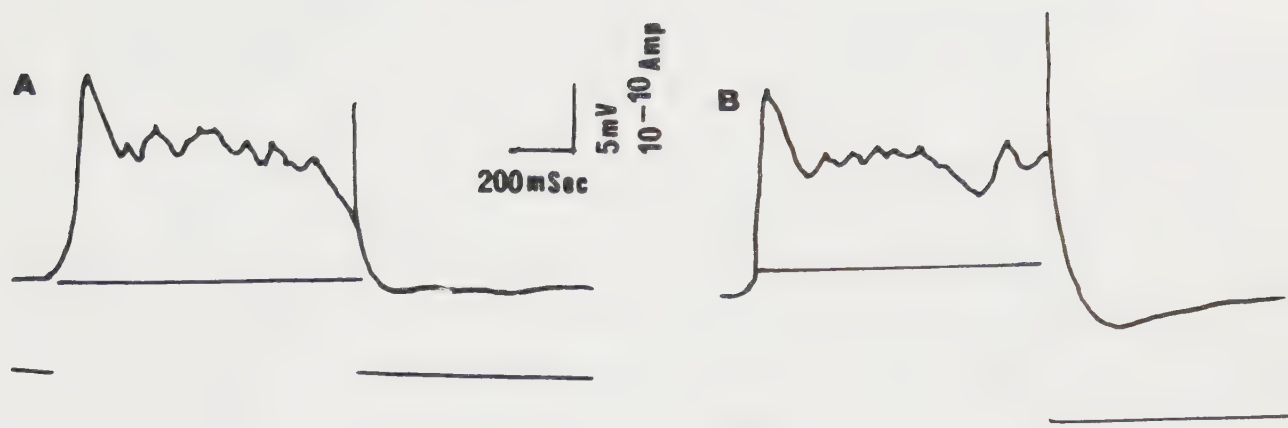


Fig. 11 Influence du potassium sur l'apparition du plateau pour des stimulations de courant sortant de longue durée.

A solution 4 mM CaCl_2 et 2 mM KCl

B solution 4 mM CaCl_2 sans potassium

Le seuil de réponse passe par un minimum pour une concentration de 2 mM de CaCl_2 . Au delà et en deça de cette valeur, le seuil s'élève. Cette augmentation est cependant plus faible pour les concentrations basses que pour les fortes concentrations.

Le potassium ne provoque pas de modification de la courbe de l'intensité de la stimulation par rapport à $[\text{Ca}^{++}]$, mais son augmentation détermine un abaissement généralisé des seuils, surtout pour les valeurs extrêmes de la concentration de Ca. Ce phénomène est particulièrement notable pour ce qui concerne l'apparition des plateaux en réponse à une stimulation de longue durée. (fig. 11).

c) sur l'amplitude des PA (fig. 12).

Dans une solution de potassium constant, l'amplitude des potentiels d'action augmente exponentiellement par rapport à l'augmentation de $[\text{Ca}^{++}]$.

Si l'on mesure cette augmentation à la hauteur de la base au sommet des pics, on obtient une variation de 5 - 6 mV pour une concentration 10 fois plus élevée. Comparée à la valeur théorique calculée pour une membrane sélective aux ions bivalents (29,5 mV), cette augmentation semble très faible, mais si l'on tient compte de la variation simultanée du potentiel de repos, l'on constate que l'augmentation réelle est de 17 - 18 mV, ce qui nous approche beaucoup plus de la valeur théorique.

d) sur le potentiel pour un rapport de Gibbs-Donnan supérieur à 8. (fig. 13).

La perfusion par une solution dans laquelle le rapport des concentrations de K et de Ca exprimé selon Gibbs-Donnan

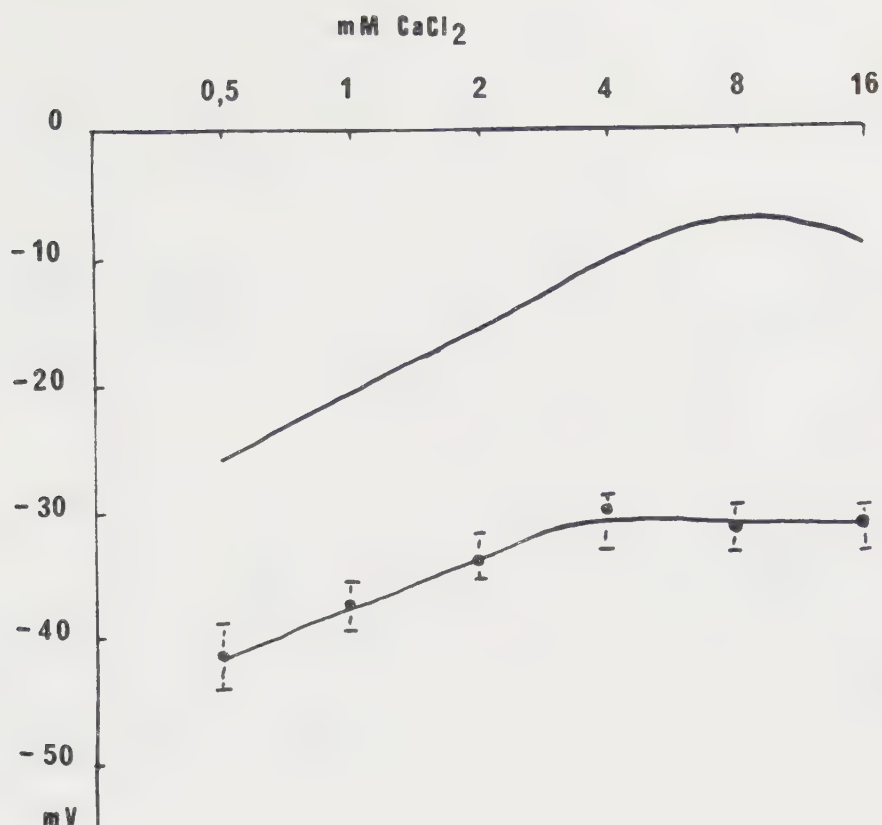


Fig. 12 Potentiel de repos et potentiel d'action de Stylonychia mytilus en fonction de la concentration extérieure de CaCl_2 ($[\text{K}^+] = 2 \text{ mM}$). Pour les faibles concentrations, les variations sont principalement dues à la dépolarisation de la membrane au repos. Pour les plus fortes concentrations, le potentiel de repos se stabilise, mais le potentiel d'action continue de varier. Chaque point représente la moyenne de cinq mesures effectuées sur des animaux différents.

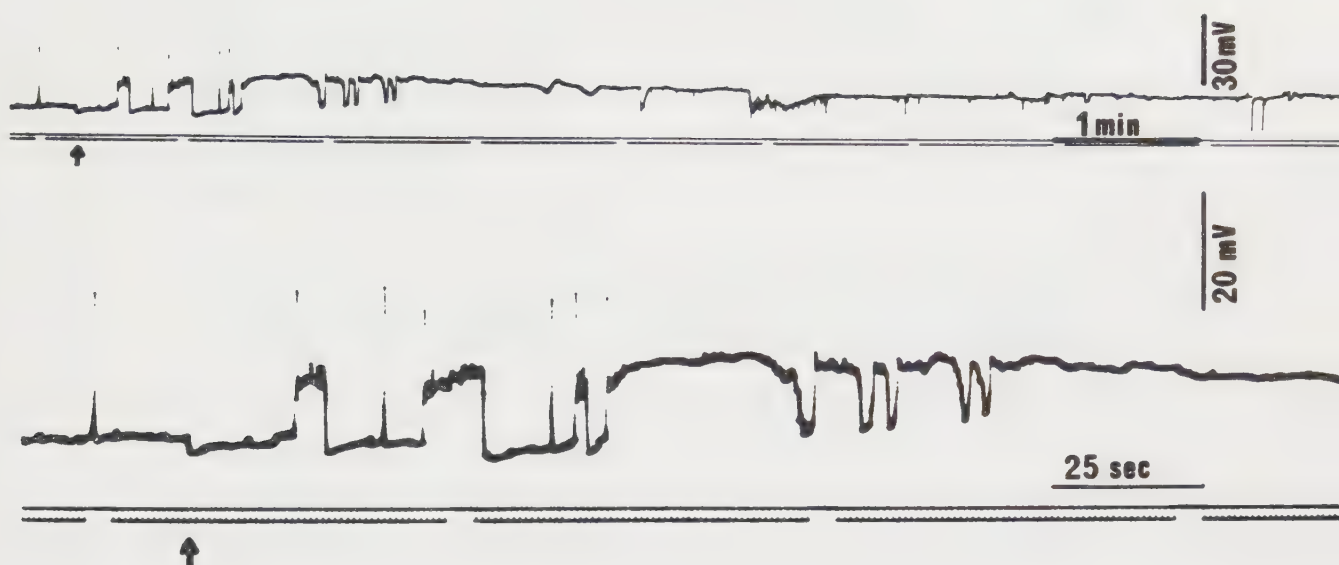


Fig. 13 Réponse électrique de *Stylonychia mytilus* à un stimulus potassique lors du passage dans une solution dont le rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ est supérieur à 8. La flèche représente le début de la perfusion avec un milieu contenant 1 mM $CaCl_2$ et 10 mM KCl. La dépolarisation est maintenue après une minute de perfusion. Elle est précédée d'une phase de dépolarisations répétitives correspondant à l'inversion ciliaire périodique (PCR) observée dans une solution dont le rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ est compris entre 6 et 8. Les repolarisations partielles observées après 1 min 30 sec à deux minutes de perfusion doivent probablement être dues à des phénomènes de turbulence créés par la perfusion et qui peuvent abaisser temporairement le rapport dans l'environnement proche de l'animal étudié.

est plus élevé que la limite de 6-8 déterminée précédemment provoque une dépolarisation sous la forme d'un pic rapide dont la repolarisation reste incomplète. Dès lors, et autant que dure la perfusion, la cellule ne retrouve plus son niveau initial de polarisation et elle devient insensible à tout stimulus aussi bien chimique que physique.

3) Quelques autres facteurs ioniques affectants la durée, l'intensité ou la forme de la réponse.

Les effets du Mg^{++} , du La^{+++} et du Ba^{++} ajoutés à la solution Ca - K ont été étudiés en relation avec le potentiel d'action. Le choix de ces trois ions a été dicté par le fait que le premier est décrit comme n'ayant que peu d'affinité pour les sites de liaison calcique chez Paramecium. (Naitoh et Yasumasu, 1967), alors que l'affinité pour ces sites est très forte pour le barium qui avec le strontium est le seul ion capable de provoquer l'apparition d'un potentiel d'action tout ou rien. (Naitoh et Eckert, 1968). Quant au lanthane, il est connu comme un inhibiteur des flux calciques, soit qu'il entre en compétition avec le Ca sur les sites de liaison anioniques, soit qu'il inactive ces sites par altération chimique de la membrane (Miledi, 1971).

La solution initiale dans ces expériences contient 4 mM $CaCl_2$, 2 mM KCl et 5 mM Tris.

a) Effets du magnésium

Le Mg^{++} ajouté au milieu ne provoque pas de variations significatives du potentiel de membrane au repos. Par contre, la vitesse de la dépolarisation lors d'un

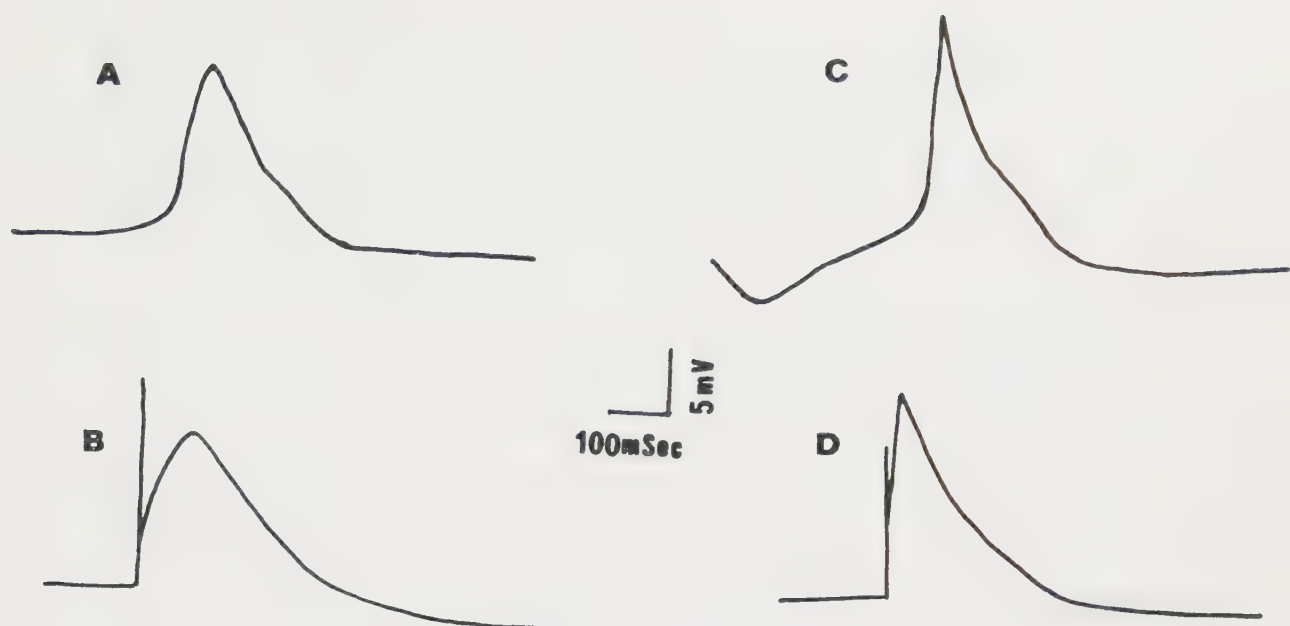


Fig. 14 Effet du Mg^{++} sur les potentiels d'action spontanés, A et B) et sur les potentiels d'action provoqués (C et D) de Stylonychia mytilus. A et C, solution ne contenant pas de Mg^{++} ; B et D solution avec Mg^{++} .

potentiel d'action est augmentée, bien que ni son amplitude, ni sa durée totale ne soient modifiées.

Le remplacement partiel de Ca^{++} par une quantité égale ion pour ion de magnésium donne des résultats identiques. (fig. 14).

Cependant, si le remplacement est effectué de telle sorte que le rapport de Gibbs - Donnan $[\text{K}^+]/\sqrt{[\text{Ca}^{++}]}$ soit supérieur à la valeur limite de 6 - 8 déterminée dans les expériences précédentes, mais que le rapport $[\text{K}^+]/\sqrt{\{\text{ions bivalents}\}}$ soit inférieur à cette limite, le comportement de l'animal reste normal. L'inversion de longue durée n'apparaît plus. Dans ces conditions expérimentales les potentiels ne sont pas modifiés, et l'animal continue à présenter des potentiels d'action spontanées et à répondre aux stimuli électriques. (fig. 14).

L'élimination progressive du calcium, par perfusion d'une solution ne contenant comme ions bivalents que du Mg^{++} en concentration isomolaire à la concentration initiale de Ca^{++} , permet d'observer un abaissement du seuil de réponse. Cela se traduit dans un premier temps par une augmentation considérable de la fréquence des potentiels d'action spontanées, puis par une diminution de leur amplitude due aussi bien à une élévation du potentiel de repos qu'à une baisse des maxima de dépolarisation, et enfin par une dépolarisation maintenue suivie d'une repolarisation lente et incomplète. Dès cet instant, la cellule devient inexcitable et ne présente plus de mouvements rapides associés à des modifications du potentiel. (fig. 15).

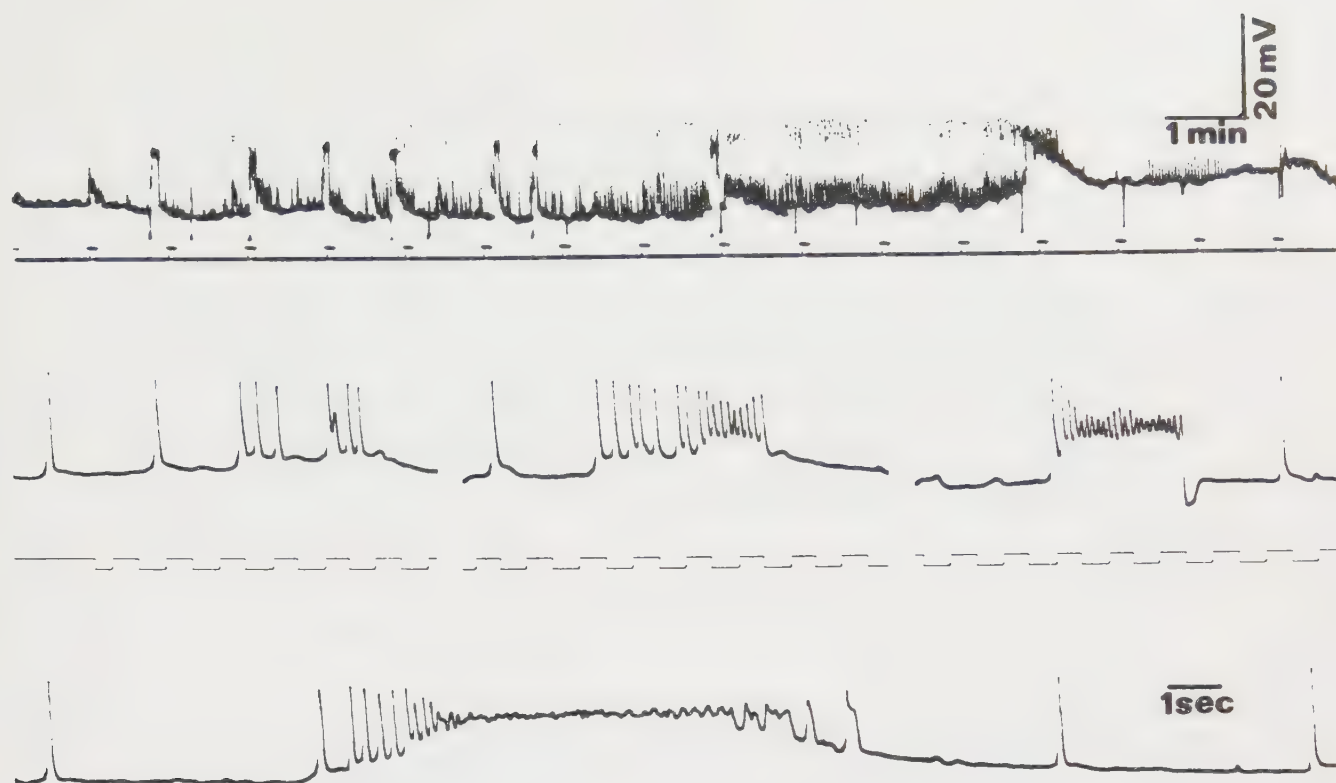


Fig. 15 Substitution progressive du Ca^{++} par le Mg^{++} .
 Tracé de haut, augmentation progressive de la fréquence
 des PA correspondant à des mouvements d'inversion (PCR),
 et inactivation de la cellule. Tracés du milieu et du
 bas : fusion PA successifs aboutissant à l'apparition
 d'un plateau.

Au cours de la première phase, et, dans certains cas, la fréquence des excitations devient suffisamment élevée pour que la repolarisation ne soit plus complète entre deux PA. Nous assistons alors à une fusion des potentiels d'action successifs d'autant plus importante que leur fréquence est plus élevée. A la limite, la fusion devient parfaite, et aboutit à un "tétanos" électrique qui n'est pas sans rappeler les plateaux déjà observés au cours des mouvements spontanés. (fig. 15).

b) Effet du Lanthane

Le premier effet du La^{+++} est de bloquer l'activité ciliaire aussi bien spontanée que provoquée chez Stylonychia mytilus. La zone des membranelles adorales est inhibée la première, et s'immobilise totalement après quelques minutes d'incubation; les mouvements des cirres marginaux sont progressivement ralentis, souvent en inversion et finissent par s'arrêter à leur tour, cependant que les cirres prennent un aspect rigide. A ce stade, où seul les cirres ventraux battent encore faiblement, apparaît généralement une vacuole intracytoplasmique dont le volume devient de plus en plus important. L'aspect général de l'animal en est déformé et la cellule finit par éclater et mourir. Une série d'expériences préliminaires nous a montré que la rapidité et l'importance des déformations ne dépendent pas seulement de la concentration de La^{3+} présent, mais aussi de la concentration en calcium de la solution. Ainsi, après 15 minutes d'exposition à une solution de 0,8 mM CaCl_2 plus 0,2 mM LaCl_3 , les cellules commencent déjà à se lyser, alors qu'après 1 heure d'exposition à 8 mM CaCl_2 plus 0,2

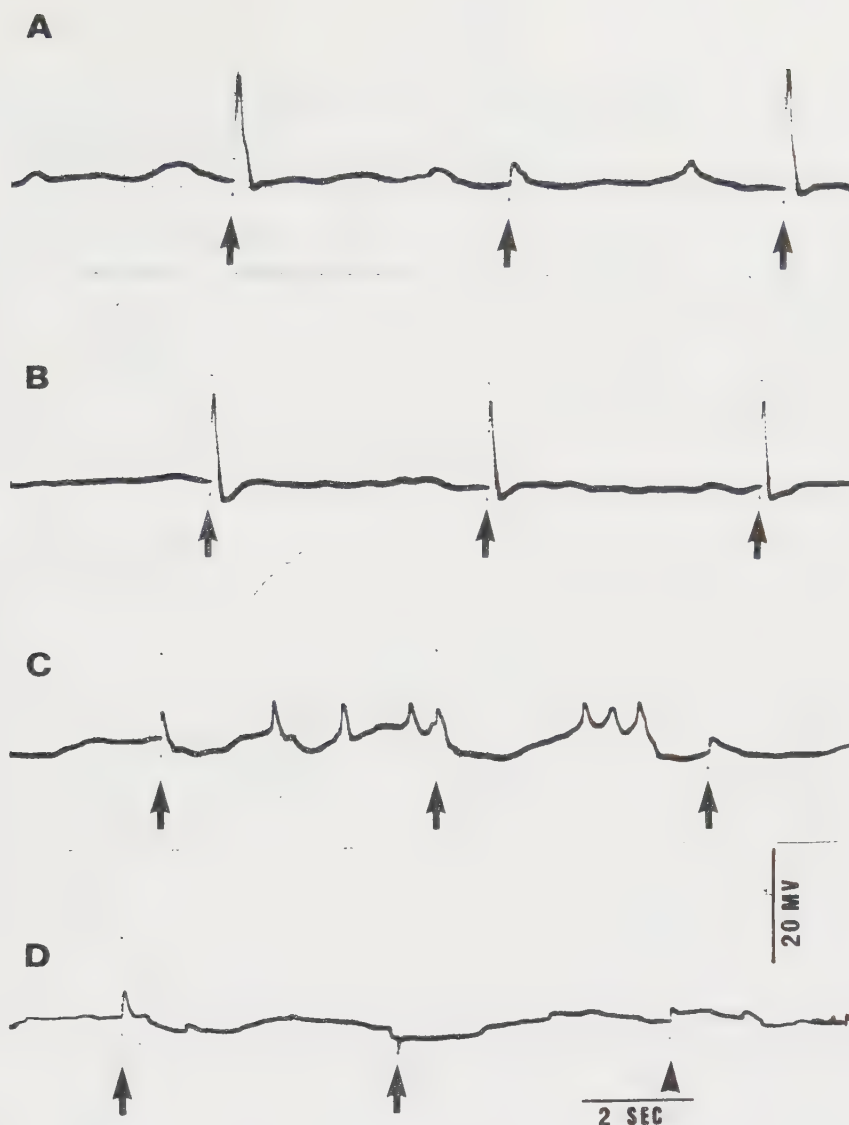


Fig. 16 Effet du La^{+++} (25 M) sur le potentiel d'action de Stylonychia mytilus dans une solution de calcium-potassium. Tracé A, témoin dans la solution sans La^{+++} . Tracé B, après 1 minute de perfusion, l'amplitude et la durée des PA à diminué. Tracé C, 5 minutes après le début de la perfusion, potentiels spontanés répétitifs de faible amplitude. Tracé D, disparition totale des réponses.

mM LaCl_3 , la vacuole est apparue, mais il n'y a pas encore de destruction cellulaire.

Ces observations, ajoutées au fait que dès l'apparition de la vacuole, la réversibilité ne peut plus être totale, nous ont incité à utiliser dans l'étude des potentiels de membrane des faibles doses de La^{++} et à n'y maintenir les animaux que pendant des périodes relativement brèves.

Après 1 minute de perfusion avec la solution d'équilibration à laquelle est ajouté 25 μ M de Lanthane, l'amplitude et la durée des PA diminue, passant de 20 ± 1 mV à 15 ± 1 mV (fig. 16 a et b). Cinq minutes après l'introduction du lanthane, les réponses accusent une sensible diminution, cependant que le potentiel transmembranaire de repos diminue. Les potentiels d'action sont favorisés et apparaissent parfois sous la forme de série plus ou moins longue de décharges répétitives (fig. 16 c). Si la perfusion se poursuit, les réponses finissent par disparaître totalement et la cellule devient inexcitable. (fig. 16 d).

Si elle est alors replacée dans un milieu sans La^{++} , la reprise des fonctions se fait par le processus inverse.

Lors d'une stimulation par une dose plus élevée de Lanthane (0,1 à 1 mM), l'inhibition apparaît plus rapidement et de façon brutale à la suite d'une dépolarisation unique de la membrane. (fig. 17). L'élimination du La suite à une stimulation de courte durée ne permet la récupération des fonctions normales qu'après une période de latence prolongée au cours de laquelle apparaissent de profondes hyperpolarisations spontanées, pouvant atteindre jusqu'à -100 mV.

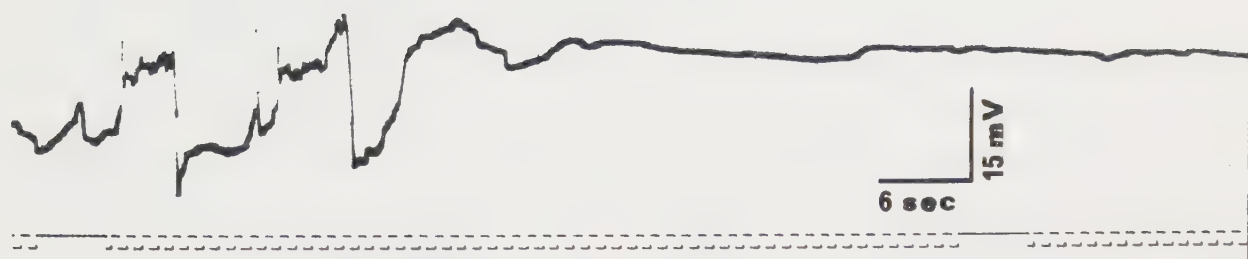


Fig. 17 Effet d'une dose plus élevée de La^{+++} (1 mM);
dépolarisation et inactivation rapide de la membrane.

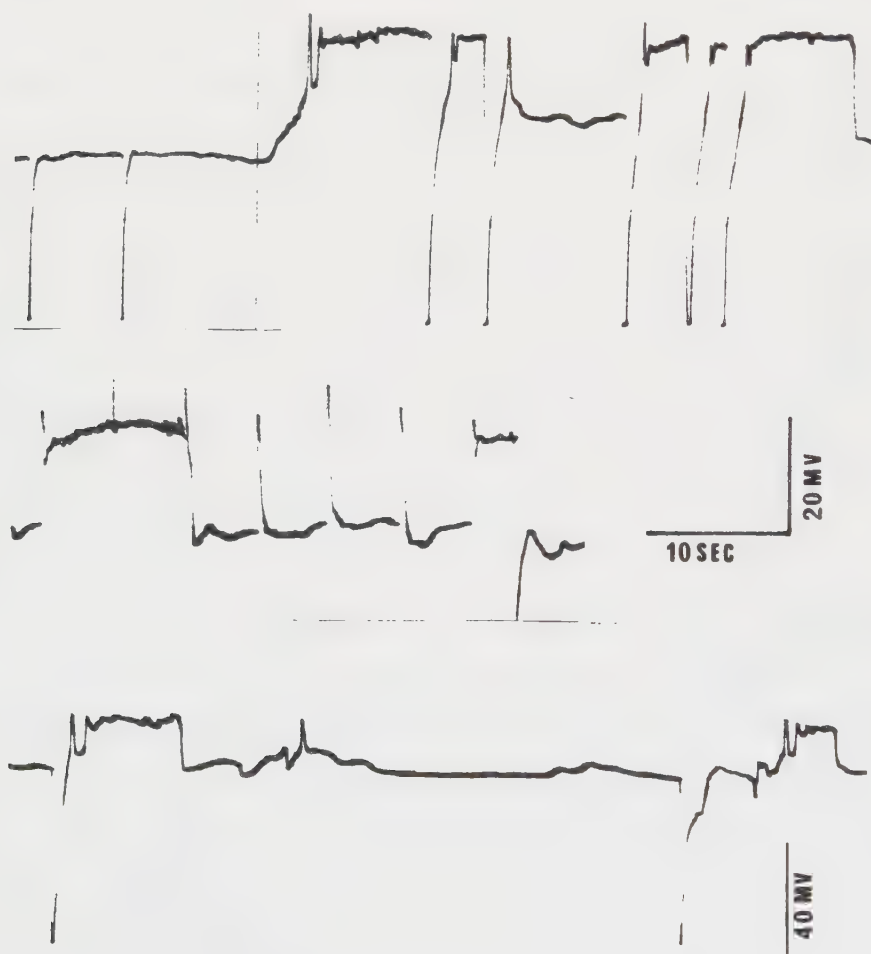


Fig. 18 Retour au milieu sans La^{+++} après une stimulation
à forte dose (1 mM). Hyperpolarisations spontanées de
forte amplitude pouvant atteindre - 100 mV.

Ces hyperpolarisations se poursuivent longtemps après que les autres fonctions soient réapparues (dépolari- sations spontanées et excitabilité). Elles peuvent avoir lieu à n'importe quel moment du cycle d'excita- tion cellulaire, et si, comme les hyperpolarisations observées lors des mouvements spontanés sans stimu- lation préalable, elles correspondent à un mouvement de l'animal vers l'avant, aucune explication n'a pu être trouvée jusqu'alors quant à la raison de l'aug- mentation considérable de leur amplitude. (fig. 18).

c) Effet du Barium

1) Modification de $[Ba^{++}]$ à $[Ca^{++}]$ constant. Lorsque la concentration de barium est modifiée entre 0,5 et 4 mM, pour une concentration de Ca de 4 mM, le po- tentiel de repos ne varie pas d'une façon signifi- cative. Par contre l'amplitude des potentiels d'action augmente linéairement d'environ 24 mV pour une con- centration de Ba^{++} décuplée, de sorte que pour les plus fortes concentrations le PA annule, et même inverse transitoirement la polarité de la membrane. Mais le phénomène le plus remarquable concerne l'augmentation de la durée du potentiel d'action.

La fig. 19 montre qu'il existe une relation pratique- ment linéaire entre la concentration de Barium et l'augmentation de la durée du PA pour de faibles va- leurs de cette concentration. Cependant à 4 mM Ba, la durée du PA passe sans transition à une valeur notable- ment plus élevée (5 - 10 sec. contre $0,6 \pm 0,1$ sec. pour 2 mM). Ce phénomène est du à l'apparition d'un pla- teau d'aspect analogue à celui que nous avons observés lors d'une inversion spontanée de longue durée dans

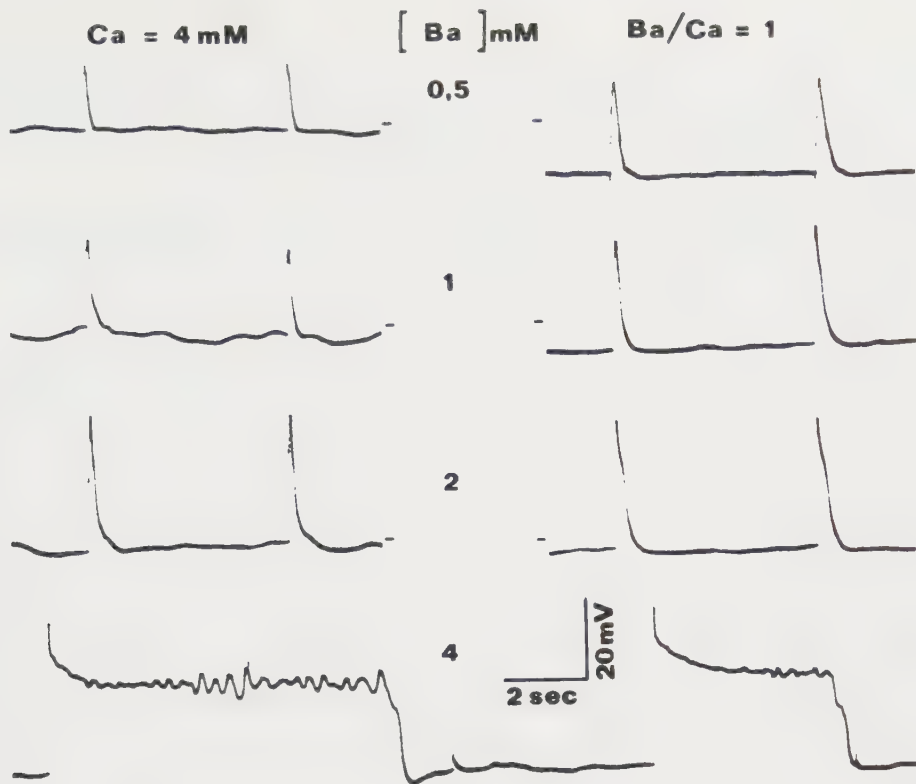


Fig. 19 Effet de la modification de la concentration de barium sur le potentiel d'action de Stylonychia mytilus. Tracés de gauche : augmentation progressive de $[Ba^{++}]$ dans un milieu de calcium constant (4 mM). Tracés de droite : augmentation de la force ionique pour un rapport $[Ba^{++}]/[Ca^{++}]$ constant ($= 1$). La variation des maxima de dépolarisation mesurée par rapport au potentiel 0 est approximativement la même dans les deux cas, et l'apparition des plateaux de longue durée est toujours favorisée par une augmentation de Ba^{++} même pour un rapport $[Ba^{++}]/[Ca^{++}]$ constant. Les tirets indiquent le potentiel - 30 mV.

un milieu sans stimulation. Ce plateau apparaît chaque fois que la cellule répond à une stimulation.

2) Modification des molarités pour un rapport $[Ba^{++}] / [Ca^{++}]$ constant. (fig. 19).

L'augmentation de la force ionique pour le rapport $[Ba^{++}] / [Ca^{++}] = 1$ constant provoque une variation du potentiel de repos qualitativement semblable à une augmentation de Ca^{++} seul. Sa valeur devient moins négative pour des concentrations ioniques plus élevées. L'amplitude des potentiels d'action mesurée à partir du potentiel de repos E_m augmente aussi, mais cette augmentation est inférieure à celle mesurée pour le calcium constant. Cela tient au fait que les potentiels d'action sont déjà plus élevées pour les faibles concentrations lorsque le rapport est maintenu constant à 1 que lorsque le calcium est maintenu à 4 mM. Par contre, mesurée en valeur absolue par rapport au potentiel zéro, la variation des sommets des PA est plus importante dans ce cas (environ 27 mV pour une concentration de Ba^{++} décuplée) que dans le précédent, puisqu'en effet, le potentiel de repos varie simultanément.

De plus, pour de faibles concentrations, les modifications des concentrations de barium et de calcium n'ont pour ainsi dire pas d'influence sur la durée des dépolarisations dans la mesure où le rapport entre les deux ions est maintenu constant. Cependant, avec l'augmentation des forces ioniques, la tendance à l'apparition de plateaux de longue durée augmente.

C'est ainsi que pour des concentrations de 0,5 mM

et de 1 mM, la fréquence de ces plateaux n'est pas plus élevée que dans le milieu sans Barium, pour 2 mM, la nombre de plateaux augmente, mais ils restent brefs (ne dépassant généralement pas 2 sec. fig. 19 et 20), alors qu'à 4 mM, chaque réponse donne lieu à un plateau, comme nous l'avons déjà vu dans le cas précédent.

3) Modification du rapport $[Ba^{++}]/[Ca^{++}]$ pour une force ionique constante.

Lorsque le rapport $[Ba^{++}]/[Ca^{++}]$ est modifié selon les concentrations 1/3, 2/2, 3/1 et 4/0, le potentiel de membrane au repos ne varie pas de façon significative. Par contre, pour les fortes valeurs du rapport, non seulement l'amplitude, mais surtout la durée des plateaux est considérablement augmentée. Pour le rapport 3/1, cette durée est 2 à 3 fois plus longue que pour les plus fortes concentrations dans le cas précédent, alors qu'elle peut atteindre 1 à 2 minutes lorsque le calcium est totalement supprimé à 4 mM de Barium. La polarité de la membrane est alors nettement inversée, avec un maximum d'"overshoot" dépassant + 15 mV, et reste inversée pendant toute la durée du plateau.

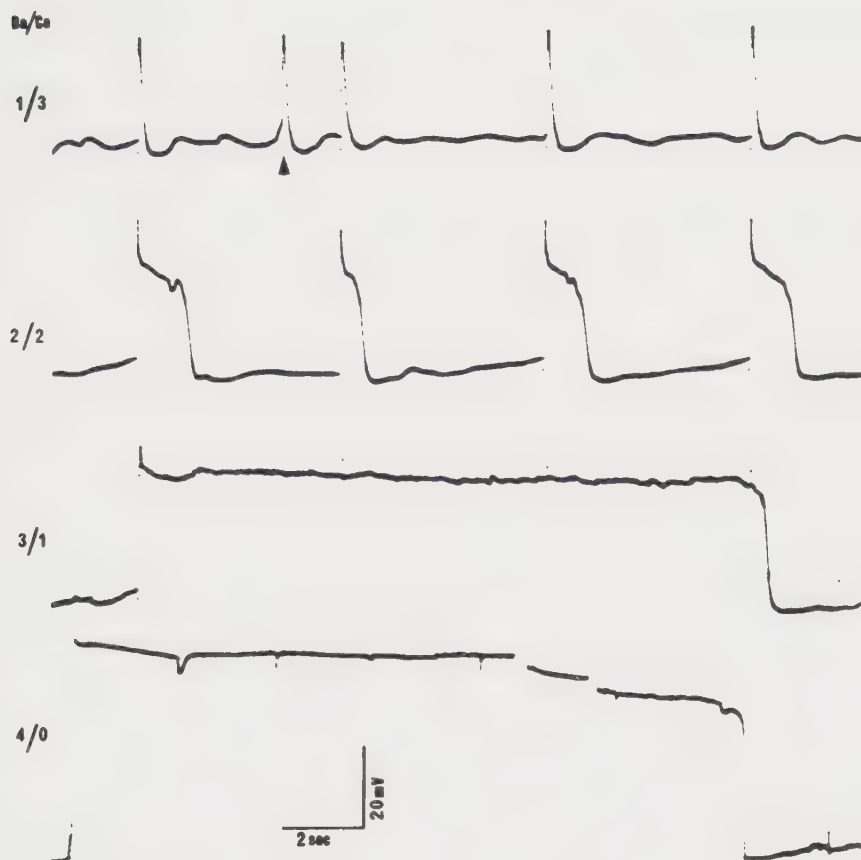


Fig. 20 Modification du rapport $[Ba^{++}]/[Ca^{++}]$ pour une force ionique constante (4 mM). L'"overshoot" devient nettement positif et la durée du plateau considérable pour des valeurs élevées du rapport.

DISCUSSION

Le mouvement d'inversion ciliaire de Stylonychia mytilus est toujours associé à une dépolarisation de la membrane qui se présente sous l'aspect d'un potentiel d'action tout ou rien d'origine calcique. Si ce PA peut être modifié, augmenté ou diminué en amplitude par certains facteurs ioniques, le calcium reste néanmoins nécessaire à son apparition.

Le problème des ions bivalents et de leur contribution au courant membranaire total au cours d'une excitation a été étudié par de nombreux auteurs sur divers tissus excitables au cours des 15 dernières années. (cf. Reuter, 1973). C'est ainsi que des PA calciques de longue durée ont été mis en évidence dans les fibres musculaires de crustacés traitées au TEA (tetraethyl - ammonium) pour lesquels ni la présence de sodium, ni celle de magnésium n'était nécessaire (Fatt et Katz, 1953; Fatt et Ginsborg, 1958; Werman et Grundfest, 1961, Hagiwara et Naka, 1964). Sur l'axone de seiche (Loligo vulgaris), Tasaki et al. (1969) ont obtenu des PA dans un milieu ne contenant dans la solution extérieure que des ions bivalents, calcium, strontium ou barium. De plus, Katz et Miledi (1970, 1971) ont provoqué des réponses régénératrices dépendantes du calcium dans les terminaisons nerveuses des synapses géantes du ganglion stellaire de seiche, après avoir bloqué la dépolarisation sodique par le TTX (tetradotoxine) et diminué le courant potassique sortant par le TEA. Enfin, de nombreux auteurs ont démontré l'importance du courant entrant calcique sur l'amplitude du plateau du potentiel d'action cardiaque chez un grand nombre d'espèces animales.

En ce qui concerne les protozoaires, tous les auteurs s'accordent à reconnaître l'importance du calcium aussi bien pour l'induction de potentiels régénérateurs que dans le domaine de la régulation et du contrôle ionique de l'inversion ciliaire.

Nous pouvons donc comparer les résultats que nous avons obtenu sur Stylonychia avec les observations faites par ces auteurs sur d'autres ciliés et particulièrement sur Paramecium.

Considérons tout d'abord le contrôle ionique de l'inversion ciliaire. Même si nous avons observé que ce n'est pas la durée de l'inversion comme chez Paramecium (Jahn, 1962) qui dépend du rapport de Gibbs-Donnan $[K] / \sqrt{[Ca]}$, il n'en reste pas moins que ce rapport demeure important dans le phénomène d'inversion ciliaire de Stylonychia. Nous pouvons donc postuler l'existence d'un système échangeur d'ions chez Stylonychia semblable à celui que Naitoh (1968) a mis en évidence chez Paramecium, et au niveau duquel une réaction se produit entre les ions K^+ et Ca^{++} , telle que :



où P représente les sites de liaisons sur la membrane.

Conformément à la "loi d'action de masse", les vitesses de réaction sont proportionnelles aux concentrations des ions en présence.

A l'équilibre, lorsque la vitesse de réaction directe égale la vitesse de réaction inverse, nous avons :

$$\frac{[PK]}{[PCa_{1/2}]} = k \frac{[K^+]}{\sqrt{[Ca^{++}]}} \quad 1$$



ou encore :

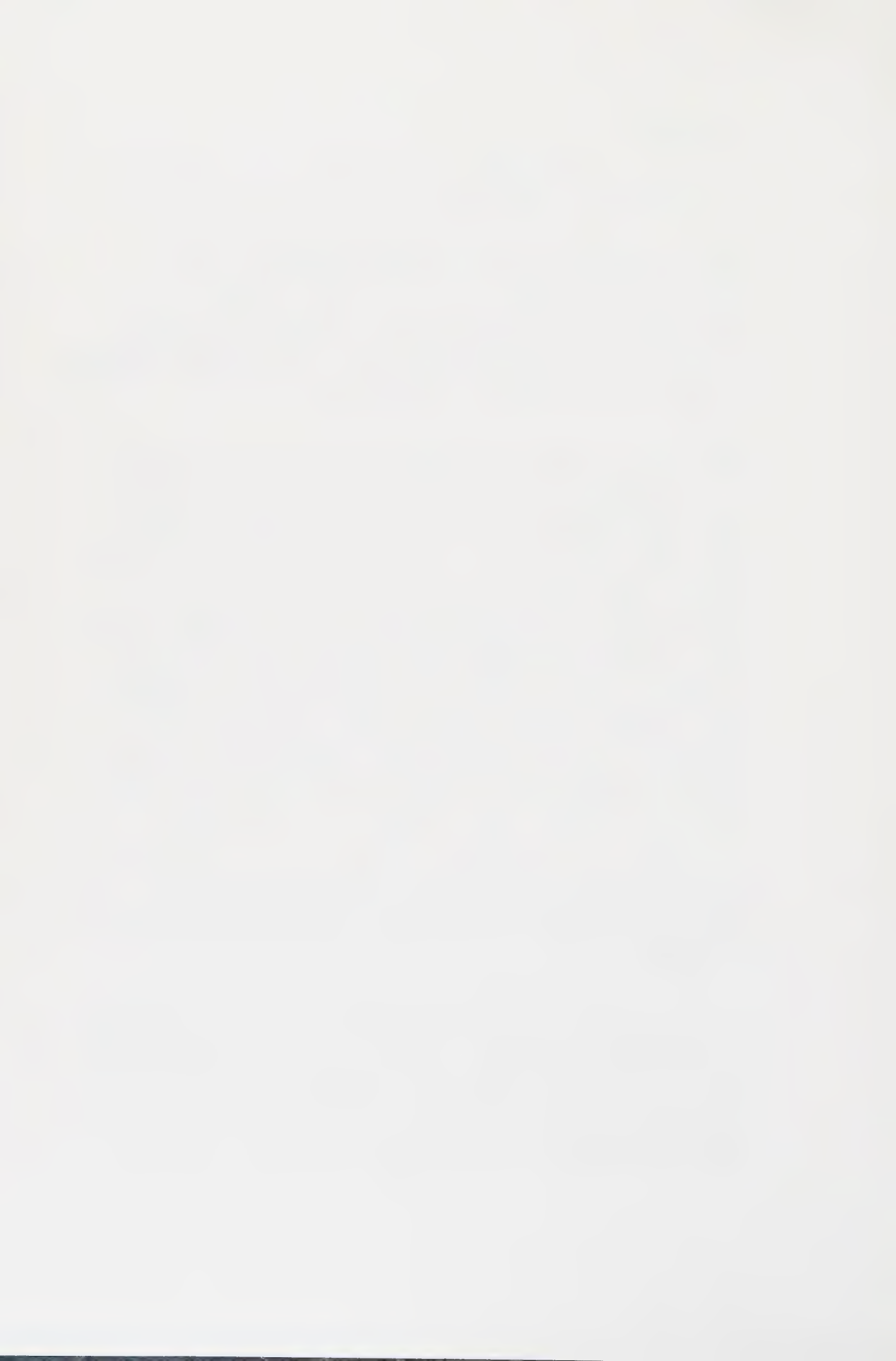
$$[\text{PCa } 1/2] = \frac{\text{Pt}}{kJ_a + 1} \quad 2$$

où $[\text{PCa } 1/2]$ représente la concentration de Ca lié;
PK la concentration de K lié; $[\text{K}^+]$ et $[\text{Ca}^{++}]$ les concentrations respectives de K et Ca dans la solution; Pt la capacité de liaison totale de la membrane et enfin J_a , le rapport de Gibbs - Donnan $[\text{K}^+]/\sqrt{[\text{Ca}^{++}]}$, k étant la constante de l'équilibre.

Selon cette formule, le nombre de liaisons calciques sur la membrane ne varie qu'avec la valeur du rapport J_a indépendamment des concentrations ioniques absolues. Si l'effet de la variation de ces concentrations reste constant pour une valeur de J_a constante, nous pouvons admettre que notre hypothèse est bonne et qu'il existe chez Stylonychia aussi un système d'échangeur ionique de ce type. Le tableau I montre que tel est bien le cas et donc que l'apparition de l'inversion ciliaire est en rapport avec la concentration de calcium lié sur la membrane, autrement dit, qu'une certaine quantité de calcium lié aux sites anioniques doit être déplacée pour obtenir cette inversion.

Par contre cela n'explique pas pour quelle raison une différence apparaît entre le comportement de Paramecium (progressif) et celui de Stylonychia (tout ou rien).

Or, l'étude des propriétés électriques de la membrane de Stylonychia mytilus comparée à celles de Paramécium montre qu'une différence du même genre apparaît à ce niveau. En effet, comme nous l'avons déjà remarqué, Stylonychia plongé dans une solution de Ca seul, présente un potentiel d'action tout ou rien. (fig. 6).



Chez Paramecium, Naitoh et Eckert (1967, 1968) ont montré que dans ces conditions l'amplitude de la réponse était variable et dépendante de l'intensité du courant appliqué.

Nous pouvons donc admettre que, lorsque $[PCa \ 1/2]$ est plus élevée qu'une certaine valeur critique, la membrane de Stylonychia mytilus est dans un état d'équilibre thermodynamique caractérisé par une absence de flux ioniques nets. Au delà de cette limite, cet équilibre est rompu et la conductance de la membrane augmente, permettant l'entrée du calcium selon son gradient électrochimique et par voie de conséquence l'inversion ciliaire.

Il est cependant bien évident que les caractéristiques de l'état d'équilibre de la membrane au repos ne dépendent pas uniquement des liaisons calciques sur cette membrane, mais aussi de la répartition thermodynamique des différents ions en présence dans les solutions, c'est à dire du potentiel de membrane.

L'étude de la polarité de la membrane de Stylonychia mytilus au repos nous permet de constater que l'augmentation des concentrations cationiques produit une dépolarisation. L'importance de celle-ci dépend de la concentration de Ca externe, puisque la pente des courbes nernstiennes qui est initialement d'environ 24 mV par decade diminue avec l'augmentation de Ca, au point que pour des concentrations supérieures à 4 mM le potentiel ne varie plus que très peu. (fig. 9).

De plus, l'augmentation de $[K]$ à $[Ca]$ constant aussi bien que celle de $[Ca]$ à $[K]$ constant provoquent une diminution de la polarité de la membrane. Il est alors évident que l'augmentation des forces ioniques, même

à J_a constant, dépolarise aussi la membrane.

Le calcium lié, de même que chez Paramecium, (Naitoh et Eckert, 1968), n'a donc pas d'effet direct sur la polarité de la membrane au repos, mais un effet indirect qui est de modifier la perméabilité de la membrane aux cations, c'est à dire les propriétés d'électrode de cette membrane.

Ces diverses observations indiquent un double effet de l'augmentation de $[Ca]$ chez Stylonychia : i) augmentation des liaisons calciques, ii) diminution du potentiel de membrane. L'action opposée de ces deux effets sur les propriétés électriques de la membrane est mis en évidence par l'étude de l'excitabilité cellulaire en réponse à un stimulus externe.

A faible concentration, une augmentation de $[Ca^{++}]$ externe induit une dépolarisation de la membrane qui tend à abaisser le seuil et une augmentation des liaisons calciques qui tend à stabiliser la membrane et à élever le seuil. Comme ces deux phénomènes s'opposent, le seuil ne varie que très peu. Par contre, à forte concentration, l'effet dépolarisant du Ca disparaît alors que le nombre des liaisons continue d'augmenter : le seuil augmente. (fig. 10).

Tout se passe comme si la diminution des liaisons calciques $[PCa \ 1/2]$ sur la membrane agissait sur le système de transport du calcium comme une dépolarisation avec pour conséquence une modification de la conductance membranaire calcique, comme c'est le cas sur l'axone de seiche en ce qui concerne la perméabilité sodique. (Frankenhaeuser et Hodgkin, 1957).

Les deux phénomènes, diminution de $[PCa \ 1/2]$ et dépolarisation, ont d'ailleurs effectivement des effets semblables, comme le montre la comparaison du tableau I et des figures 8 et 13. Pour de faibles valeurs de

J_a comme pour de faibles dépolarisations l'activité spontanée n'est pas modifiée; à valeurs moyennes, l'un comme l'autre induisent des inversions périodiques accompagnées de potentiels d'action répétitifs, et à valeurs élevées, ils provoquent une dépolarisation unique suivie d'un plateau qui dure tant que le stimulus est maintenu.

L'étude des autres facteurs ioniques que nous avons faite permet d'apporter quelques arguments supplémentaires à l'appui de cette théorie. Ainsi, l'effet du Mg^{++} peut être expliqué par deux propriétés de ce ion, a) son affinité pour les sites d'activité membranaires est inférieur à celle des autres ions (Naitoh, 1967), b) il possède les mêmes propriétés stabilisatrices que le Ca^{++} , bien que son efficacité soit moins grande (Frankenhaeuser et Hodgkin, 1957). Il est alors évident d'une part qu'en présence de Mg^{++} dans une solution contenant du Ca^{++} , les propriétés de la membrane ne seront que peu modifiées et d'autre part, que la présence dans la solution en quantité suffisante sera capable de maintenir la stabilité de la membrane même pour un rapport $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ inférieur à la valeur critique mesurée. Enfin cela peut expliquer que lors du remplacement ion pour ion de Ca^{++} par le Mg^{++} , l'excitabilité cellulaire augmente et des potentiels d'action répétitifs apparaissent suivie d'une dépolarisation maintenue.

L'action du Lanthane, qui favorise les dépolarisations répétitives avant de bloquer totalement l'activité calcique, pourrait, elle, s'expliquer par le fait que le La^{+++} déplacerait un certain nombre de liaisons calciques sur la membrane et ainsi augmenterait la conductance g_{Ca} .

Enfin, le même genre de phénomène apparaît lors de l'introduction de Ba^{++} dans la solution. Comme le

Ba^{++} semble avoir une forte affinité pour les sites de liaisons membranaires (Naitoh et Yasumasu 1957), il entre en compétition pour ces sites avec le Ca^{++} selon une cinétique conforme à la loi d'action de masse. L'augmentation de Ba^{++} dans la solution augmente alors les liaisons de cet ion sur la surface du protozoaire tout en y diminuant la concentration des liaisons calciques. Bien que cet effet de la baisse de $[PCa\ 1/2]$ en présence de Ba^{++} ne soit probablement pas le seul en cause, il est tout de même probable qu'il joue un certain rôle dans le fait que l'excitabilité de la cellule soit augmentée et que, à partir d'un certain rapport de $[Ba^{++}] / [Ca^{++}]$, les réponses apparaissent en plateaux de longue durée.

Toutes ces observations sur l'excitabilité de Stylo-nychia mytilus tendent donc à démontrer que le facteur le plus important dans ce domaine est le nombre de liaisons calciques $[PCa\ 1/2]$ fixées sur sa membrane.

Cependant, en ce qui concerne le cycle d'activité, une caractéristique particulière des potentiels d'action se fait jour, leur faible amplitude.

Si l'on applique le principe de la théorie sodique de l'excitation (Hodgkin 1951) à notre PA calcique, le potentiel de membrane pendant l'activité doit approcher le potentiel d'équilibre des ions bivalents donné par l'équation de Nernst :

$$E_{Ca} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} \approx 30 \log \frac{Ca_o}{Ca_i} \cdot (mV) \quad 3$$

Or, bien qu'il nous ait été impossible de mesurer la concentration interne des ions calciques libres, nous pouvons admettre qu'elle est inférieure à $10^{-6}M/l$, (Naitoh 1972).

Par conséquent, le potentiel d'équilibre du calcium doit être nettement supérieur à 0 mV, et on devrait s'attendre à des amplitudes de dépolarisation beaucoup plus importantes que celles que nous avons observées.

Le fait qu'il n'en est rien peut être attribué soit à la présence d'un courant sortant qui augmente progressivement en fonction du temps et du potentiel et qui courtcircuite la plus grande partie du courant calcique entrant, soit à une inactivation de g_{Ca} au cours de la dépolarisation, soit encore au fait que le calcium se répartisse de façon inhomogène à l'intérieur de la cellule, de sorte que Ca_i augmente plus rapidement dans certains compartiments.

Si l'on exprime la valeur de chacun des courants par la loi générale des générateurs, en admettant que le courant entrant soit calcique et le courant sortant potassique, nous avons :

$$\begin{aligned} I_{Ca} &= g_{Ca} (E_p - E_{Ca}) \\ I_K &= g_K (E_p - E_K) \end{aligned} \quad 4$$

En E_p , qui représente la polarité de la membrane au maximum de dépolarisation du PA, $I_{Ca} = I_K$, d'où :

$$\frac{g_{Ca} (E_p - E_{Ca})}{g_K (E_p - E_K)} = 1 \quad 5$$

Selon cette expression, E_p n'approche E_{Ca} que pour des valeurs très élevées du rapport g_{Ca}/g_K , et plus le rapport reste faible, c'est à dire, plus g_K est élevé par rapport à g_{Ca} , plus l'amplitude du PA est petite. (Reuter, 1973).

Une observation complémentaire, concernant les variations de E_p lorsque la concentration de calcium externe est modifiée, permet de suspecter la présence du courant sortant. En effet, toujours selon la théorie de l'excitation, si l'on modifie les concentrations externes de calcium $[Ca^{++}]_o$, l'équation 3 peut s'écrire :

$$(E_p) [Ca]_{ot} - (E_p) [Ca]_{os} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Ca]_{os}}{[Ca]_{ot}} \quad 6$$

où $(E_p) [Ca]_{ot}$ et $(E_p) [Ca]_{os}$ représentent les maxima de dépolarisation dans une solution test de concentration $[Ca]_{ot}$ variable, respectivement, dans une solution standard de concentration $[Ca]_{os}$ fixe. Une modification de $[Ca]_{ot}$ dans un rapport de 1 à 10 devrait donner une augmentation de 29,5 mV de $(E_p) [Ca]_{ot}$.

Cependant, chez Stylonychia, l'augmentation n'est que d'environ 17 mV par décade. (fig. 12). Une telle différence suggère que l'augmentation de la perméabilité de la membrane n'est pas sélective pour le calcium. Dans ce cas, l'équation 6 devient caduque puisqu'elle ne tient compte que de la différence de potentiel électrochimique calcique, et comme malgré tout le seul ion entrant reste le calcium, nous sommes obligés d'admettre l'existence d'un courant sortant qui modifie la relation. L'équation 5, qui tient compte des courants entrants et sortants, peut par contre être appliquée, et nous permet de déduire que plus le rapport g_{Ca} / g_K est faible, plus la pente des points déterminés par les valeurs de E_p est réduite.

Nous devons donc admettre que le potentiel d'action chez Stylonychia mytilus est déterminé aussi bien

par la conductance calcique que par la conductance potassique et que cette dernière est suffisante pour court-circuiter la plus grande partie du courant calcique entrant.

Cette conclusion rejoint celle que Hagiwara et al. (1964) ont tiré de l'étude des fibres musculaires de crustacés, en montrant que le sommet des potentiels d'action calciques est une fonction linéaire de $[Ca]_{ext}/[K]_{int}$ pour $[Ca]_{int}$ inférieure à 10^{-7} M.

D'autres similitudes concernant les modifications des PA provoquées par certains ions peuvent être observées entre Stylonychia et les fibres musculaires de crustacés : le peu d'influence du Mg^{++} et son incapacité à provoquer l'apparition de potentiels d'action en absence de Ca^{++} ; l'effet inhibiteur du La^{+++} aussi bien sur l'entrée du calcium que sur la sortie du potassium, démontré par la disparition totale des PA, en présence de doses même faibles de La^{+++} , (fig. 16 et 17), ou l'augmentation des amplitudes des PA provoquée par le Ba^{++} , ce dernier effet étant dû, comme chez Paramecium, d'une part à la participation du baryum au courant entrant et à sa capacité de se substituer au Ca comme transporteur de charge, d'autre part à une inhibition du courant sortant par diminution de la conductance g_K . (fig. 19).

Il est cependant un phénomène qui n'apparaît chez aucune de ces autres cellules; l'apparition de plateaux de longue durée suivant un potentiel d'action bref dont la repolarisation est incomplète et au cours duquel la polarité reste plus basse qu'au repos.

Pendant toute la durée du plateau, les organites locomoteurs sont maintenus en inversion, ce qui indique vraisemblablement un taux de Ca ionisé élevé à l'intérieur de la cellule. De plus, l'adjonction de K (fig. 11 et 13) ou de Ba (fig. 19 et 20) à la solution extérieure, ainsi qu'une stimulation de longue durée par courant sortant favorisent l'apparition des plateaux, mais ils disparaissent de même que les PA brefs en absence de Ca. Enfin, la figure 15 indique que ces plateaux sont le résultat de la fusion de PA brefs répétitifs.

Cela indique que le plateau est dû, soit au maintien d'une conductance calcique (g_{Ca}) élevée, soit à une réduction de la conductance potassique (g_K), soit à ces deux phénomènes simultanément.

Le maintien d'une conductance calcique élevée semble être un facteur important, puisqu'en absence de Ca extracellulaire ou en présence de La^{+++} l'inversion, aussi bien que les PA suivis de plateaux ou non disparaissent.

Quant à la réduction de la conductance potassique, c'est probablement le facteur qui est à l'origine de l'augmentation de la durée des potentiels d'action en présence de Ba, comme cela a été observé sur les muscles de crustacés (Werman et Grundfest, 1961).

Cette dernière remarque peut cependant être sujette à caution, si l'on considère, comme nous l'avons déjà vu, que le Ba entre en compétition avec le Ca sur les sites de liaisons anioniques de la membrane. Dans ce cas il devient difficile de déterminer si le potentiel d'action est prolongée parce que le Ba lié, en modifiant les propriétés de la membrane, retarde l'inactivation de la conductance aux ions entrants,

ou la conductance potassique repolarisante. Mais le fait que pour le rapport Ba/Ca constant les plateaux soient aussi favorisés aux plus fortes concentrations (fig. 19) montre que ce n'est en tout cas pas seulement la concentration de Ba lié qui entre en ligne de compte dans ce phénomène. Par conséquent, la diminution de la conductance g_K facilite bien la formation de plateaux.

En conclusion, nous pouvons dire que si l'excitabilité de la membrane de Stylonychia mytilus dépend essentiellement de la concentration des ions Ca fixés sur la membrane (PCa), l'amplitude et la durée des PA sont une fonction autant de la conductance calcique de la membrane (g_{Ca}) que de la conductance potassique (g_K).

BIBLIOGRAPHIE

- BINGLEY M.S., 1966, Membrane poteniels in Amoeba proteus J. exp. Biol., 45; 251.
- DRYL S., 1958, Photographic registration of movement of Protozoa. Bull. Ac. Pol. Sci., S. Sci. Biol. 6; 429.
- FATT P., GINSBORG B.L., 1958, The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibers. J. Physiol. 142; 516.
- FATT P., KATZ B., 1953, The electrical properties of crustacean muscle fibers. J. Physiol., 120? 171.
- FERGUSON M.L., 1957, Photographic technique for quantitative studies of Paramecium and other mobile cells. Physiol. Zool. 30; 208.
- FRANKENHAEUSER B., HODGKIN A.L., 1967, The action of calcium on the electrical properties of squid axons. J. Physiol. 137; 218.
- GREBECKI A., 1965, Role of Ca^{++} ions in the excitability of protozoan cell. Decalcification, recalcification, and the ciliary reversal in P. caudatum. Acta protozool. 2; 275.
- HAGIWARA S., NAKA K.I.; 1964, The initiation of spike potential in barnacle muscle fiber under low intracellular Ca^{++} . J. gen. Physiol. 48; 141.
- HAGIWARA S., CHICHIBU S., NAKA K.I.; 1964, The effects of various ions on resting and spike potentials of barnacle muscle fibers. J. gen. Physiol., 48; 165.
- HISADA, 1957, Membrane resting and action potentials from a protozoan, Noctiluca scintillans. J. cell. Comp. Physiol. 50; 57.
- HODGKIN A.L., 1951, The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Rev. 26; 339.
- JAHN T.L., 1962, The mecanism of ciliary movement II. Ion antagonism and ciliary reversal. J. cell. comp. Physiol. 60; 217.
- JENNINGS H.S., 1897, Studies on reaction to stimuli in unicellular organisms. I. Reactions to chemical, osmotic and mechanical stimuli in the ciliate infusoria. J. Physiol. (London), 21; 258.

- KAMADA T., 1934, Some observations on potential differences across the ectoplasm membrane of Paramecium. J. expl. Biol. 18; 94.
- KAMADA T., 1940, Ciliary reversal of Paramecium. Proc. Imp. Acad. (Tokyo)., 16; 241.
- KAMADA T., KINOSITA M., 1940, Calcium-Potassium factor in ciliary reversal of Paramecium. Proc. Imp. Acad. Tokyo), 16; 125.
- KATZ B., MILEDI R., 1970, Further study of the role of calcium in synaptic transmission. J. Physiol. 207; 789.
- KATZ B., MILEDI R., 1971, The effect of prolonged depolarization on synaptic transfer in the stellate ganglion of the squid. J. Physiol., 216; 503.
- KINOSITA H., 1954, Electric potentials and ciliary response in Opalina. J. Fac. Sci. Univ. (Tokyo). Sect. IV; 7; 1.
- KINOSITA H., DRYL S., NAITOH Y., 1964, Changes in the membrane potential and the responses to stimuli in Paramecium. J. Fac. Sci. Univ. (Tokyo); Sect. IV; 10; 291.
- KINOSITA H., DRYL S., NAITOH Y., 1964, Relation between the magnitude of membrane potentials and ciliary activity in Paramecium. J. Fac. Sci. Univ. (Tokyo); Sect. IV; 10; 303.
- KINOSITA H., MURAKAMI A., 1967, Control of ciliary motion. Physiol. Reviews, 47; 53.
- MACHEMER H., 1965, Analyse kurzzeitlicher Bewegungerscheinungen des Ciliaten Stylonychia mytilus. Ehrenberg. Arch. Protistenk. 108; 153.
- MACHEMER H., 1966, Zur Koordination und Wirkungsweise der Membranellen von Stylonychia mytilus. Arch. Protistenk., 109; 257.
- MACHEMER H., 1969, Filmbildanalysen vier verschiedener Schlagmuster des Marginalcirren von Stylonychia. Z. vergl. Physiol. 62; 183.

- CAST S.O., NADLER J.A., 1962, Reversal of ciliary action in Paramecium caudatum. J. Morphol. 43; 105.
- VERTON, 1923, Studien über Flimmerbewegung. Pflueger's Arch. Ges. Physiol. 192; 1.
- MILEDI R., 1971, Lanthanum ions abolish the calcium response of nerve terminals. Nature, 229; 410.
- NAITOH Y., 1958, Direct current stimulation of Opalina with intracellular microelectrode. Annot. Zool. Japan. 31; 59.
- NAITOH Y., 1968, Ionic control of the reversal response of cilia in Paramecium caudatum: A calcium hypothesis. J. gen. Physiol. 51; 85.
- NAITOH Y., ECKERT R., 1967, Action potential in Paramecium. J. gen. Physiol. 50; 2489.
- NAITOH Y., ECKERT R., 1968, Electrical properties of Paramecium caudatum: Modification by bound and free cations. Z. vergl. Physiol. 61; 427.
- NAITOH Y., ECKERT R., 1968, Electrical properties of Paramecium caudatum: All-or-none electrogenesis. Z. vergl. Physiol. 61; 453.
- NAITOH Y., ECKERT R., FRIEDMAN K., 1972, A regenerative calcium response in Paramecium. J. exp. Biol. 56; 667.
- NAITOH Y., YASUMASU I., 1967, Binding of Ca ions by Paramecium caudatum. J. gen. Physiol., 50; 1303.
- REUTER H., 1973, Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Progr. Biophys. molec. Biol. 26; 1.
- TASAKI I., LERMAN L., WATANABE A., 1969, Analysis of excitation process in squid giant axons under bi-ionic conditions. Am. J. Physiol. 216; 130.
- UEDA K., 1961, Electrical properties of Opalina. Factors affecting the membrane potential. Annot. Zool. Japan. 34; 99.
- UEDA K., 1961, Electrical properties of Opalina. Factors affecting the membrane resistance. Annot. Zool. Japan, 34; 161.

- WERNER R., GRUNDFEST H., 1961, Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. II The effects of alkali-earth and onium ions on lobster muscle fibers. J. gen. Physiol. 44; 997.
- YAMAGUCHI T., 1960, Studies on the modes of ionic behavior across the ectoplasmic membrane of Paramecium. Electric potential differences measured by the intracellular microelectrode. J. Fac. Sci. Univ. (Tokyo). Sect. IV. 8; 573.
- YAMAGUCHI T., 1960, Studies on the modes of ionic behavior across the ectoplasmic membrane of Paramecium. In- and out-fluxes of radioactive calcium. J. Fac. Sci. Univ. (Tokyo), Sect. IV. 8; 593.

